

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus dem Institut für Pathophysiologie

**Funktionelle Auswirkungen von humanem koronarem Aspirat-
Plasma: Untersuchungen im Rattenherz-Bioassay**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

**Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen**

**Vorgelegt von
Helmut Raphael Lieder
aus Essen**

Dekan: Herr Univ. -Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P. Kleinbongard

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. S. Möhlenkamp

3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. C. von zur Mühlen, Freiburg

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2017

Dieser Dissertation liegt folgende Originalarbeit zugrunde:

Lieder HR, Baars T, Kahlert P, Kleinbongard P (2016):

Aspirate from human stented saphenous vein grafts induces epicardial coronary vasoconstriction and impairs perfusion and left ventricular function in rat bioassay hearts with pharmacologically induced endothelial dysfunction. *Physiol Rep.* 4 (15) pii: e12874. doi: 10.14814/phy2.12874

1	<u>Einleitung</u>	<u>5</u>
1.1	Zielsetzung	7
2	<u>Material und Methoden.....</u>	<u>8</u>
2.1	Material	8
2.1.1	Geräte	8
2.1.2	Chemikalien.....	9
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	10
2.1.4	Puffer und Lösungen	11
2.2	Methoden	12
2.2.1	Studien Kohorte.....	12
2.2.2	Stentimplantation und Anwendung des Aspirations-/Okklusionsschutzsystems 13	
2.2.3	Blutproben	14
2.2.4	Bestimmung der Serotonin- und Troponinkonzentration im Plasma.....	15
2.2.5	Tierexperimente.....	15
2.3	Statistik.....	20
3	<u>Ergebnisse</u>	<u>20</u>
3.1	Patienten Charakteristika	20
3.2	Isolierte epikardiale Koronararterien der Ratte.....	21
3.2.1	Plasma-induzierte Vasokonstriktion	21
3.2.2	Vasokonstriktion induziert durch exogenes Serotonin.....	22
3.3	Isoliert perfundiertes Rattenherz.....	23
3.3.1	Koronararterielles Plasma und Aspirat-Plasma.....	23
3.3.2	Korrelation zwischen der Serotoninkonzentration im Aspirat-Plasma und der Reduktion im KF und LVDD	24
3.3.3	Plasma von Kontrollprobanden, versetzt mit exogenem Serotonin	28
4	<u>Diskussion.....</u>	<u>31</u>
4.1	Aspirat-Plasma induziert eine Vasokonstriktion und reduziert die koronare Perfusion und linksventrikuläre Funktion	31
4.2	Serotonin als Hauptmediator der KF und LVDD Reduktion in isoliert perfundierten Rattenherzen.....	33
4.3	Heterogene Effekte von Serotonin in der koronaren Makro- und Mikrozirkulation 33	
4.4	Limitationen	34
4.5	Klinische Implikationen	35
5	<u>Zusammenfassung</u>	<u>37</u>
6	<u>Literaturverzeichnis.....</u>	<u>38</u>
7	<u>Anhang</u>	<u>42</u>
7.1	Tabellen	42
7.2	Abbildungen	45
8	<u>Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>46</u>
9	<u>Danksagung</u>	<u>47</u>
10	<u>Lebenslauf.....</u>	<u>48</u>

1 Einleitung

Die koronare Atherosklerose ist eine chronisch progrediente Erkrankung. In deren Verlauf können Gefäßlumen einengende koronare Plaques ausgebildet werden, die eine ausreichende Blutversorgung eines Herzmuskelareals einschränken. Eine spontane Ruptur dieser Plaques kann nicht nur zu einem thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes und zur Infarzierung des versorgten Herzmuskelareals führen, sondern bei einem residualen Blutfluss auch atherosklerotischen Debris in die nachgeschaltete Mikrozirkulation embolisieren (Heusch et al., 2009a).

Chirurgisch angelegte aortokoronare Venenbypässe können über einen Umgehungskreislauf eine ausreichende Blutversorgung des Herzmuskels wiederherstellen, sind allerdings von einer akzelerierten progredienten Atherosklerose betroffen (Safian, 2002). In 14-40% aller Patienten, die einen aortokoronaren Venenbypass erhalten haben, führt diese Atherosklerose bereits innerhalb der ersten 10 Jahre nach der Operation erneut zu einer behandlungsbedürftigen Stenose in dem Bypassgefäß selbst (Weintraub et al., 1994, Petrovic et al., 2015). Neben der erneuten Anlage eines Venenbypasses stellt die interventionelle Stentimplantation in die atherosklerotische Stenose eine Therapiemöglichkeit dar, um eine ausreichende Blutversorgung des nachgeschalteten Herzmuskelareals wiederherzustellen.

Die Implantation eines Stents in das Lumen eines atherosklerotisch stenosierten Koronargefäßes oder eines atherosklerotisch degenerierten aortokoronaren Venenbypasses verursacht eine Ruptur der atherosklerotischen Plaque (Heusch et al., 2009a). Wie die spontane, führt auch die iatrogene Plaque-Ruptur auf der einen Seite zu einer Freisetzung von partikulären Bestandteilen (Heusch et al., 2009b) und Mikropartikeln (Horn et al., 2015) und auf der anderen Seite zu einer Freisetzung von löslichen, vasoaktiven, thrombogenen und inflammatorischen Mediatoren (Kleinbongard et al., 2012). Dieser „Cocktail“ aus mobilisierten partikulären Bestandteilen und freigesetzten löslichen Mediatoren embolisiert während einer Stentimplantation mit dem Blutstrom in die nachgeschaltete koronare Mikrozirkulation. Die Embolisation partikulärer Bestandteile beeinträchtigt die koronare mikrovaskuläre Perfusion und die kardiale Kontraktilität durch eine physikalische Obstruktion der kleinsten Gefäße, verursacht peri-interventionelle Mikroinfarkte und induziert eine lokale Entzündungsreaktion (Heusch et al., 2009a). Freigesetzte, lösliche Mediatoren können eine Vasokonstriktion induzieren und so die koronare mikrovaskuläre Perfusion zusätzlich beeinträchtigen (Kleinbongard et al., 2012). Die Verwendung von distalen Aspirations-/Okklusionsschutzsystemen ermöglicht das Absaugen der partikel- und mediatorhaltigen stehenden Blutsäule (das sogenannte „Aspirat“) während einer Stentimplantation in dem jeweiligen Gefäß und

verhindert somit eine Embolisation stromabwärts. Dem Einsatz dieser genannten Systeme liegt für Interventionen in aortakoronaren Venenbypässen eine I (B) Leitlinien Empfehlung zugrunde (Smith et al., 2006), allerdings ist der klinische Nutzen dieser Systeme eher gering (Brennan et al., 2015).

Das „no-reflow“ Phänomen beschreibt einen angiographisch sichtbar verminderten bis aufgehobenen myokardialen Blutfluss im Perfusionsgebiet eines Koronargefäßes, wobei das Blut zuführende Koronargefäß selbst angiographisch durchgängig erscheint (Kloner et al., 1974). Angaben zur Inzidenz des Auftretens eines no-flows schwanken stark in Abhängigkeit des untersuchten Patientenkollektivs (Harrison et al., 2013) und der verwendeten Detektionsmethode. Für Interventionen in Venenbypässen sind allerdings Inzidenzen von 12-42% beschrieben (Kaplan et al., 1996, Sdringola et al., 2001, Michaels et al., 2002). Die akute peri-interventionelle Beeinträchtigung der koronaren Perfusion im Sinne eines no-reflow ist eine Komplikation, welche die Prognose des Patienten erheblich verschlechtert (Resnic et al., 2003). In der Regel tritt das no-reflow Phänomen im Anschluss an eine koronare Intervention auf (Rezkalla and Kloner, 2002). Die Behandlung eines no-reflow ist schwierig und es existieren keine überzeugenden Richtlinien (Kleinbongard et al., 2012).

Während die funktionellen Konsequenzen der embolisierten partikulären Bestandteile durch exogene Gabe von Partikeln im Tiermodell bereits gut untersucht sind (Heusch et al., 2009a), wurden die Auswirkungen der in das koronare Blut freigesetzten löslichen Mediatoren auf die koronare Perfusion und die kardiale Kontraktilität im Tiermodell noch nicht umfassend untersucht. Das während der Stentimplantation in Venenbypässen mittels Aspirations-/Okklusionsschutzsystem als „Abfallprodukt“ gewonnene Aspirat wurde hier verwendet um zu analysieren, welche Mediatoren während einer Plaqueruptur freigesetzt werden. Hier wurden die funktionellen Auswirkungen dieser Mediatoren im Bioassay weiter charakterisiert. Unter den freigesetzten löslichen Mediatoren ist Serotonin der Hauptmediator einer starken Vasokonstriktion in isolierten Mesenterialarterien der Ratte. Neben Serotonin werden $\text{TNF}\alpha$ und Thromboxan als weitere lösliche Mediatoren freigesetzt, die jedoch an der Aspirat-Plasma induzierten Vasokonstriktion in isolierten Mesenterialarterien der Ratte nur einen geringen Anteil haben (Kleinbongard et al., 2012). Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die kardiale Zirkulation ist nur bedingt möglich: (A) in den vorherigen Studien wurden nur arterielle Segmente aus der Makrozirkulation der Ratte verwendet, wobei Effekte in der Mikrozirkulation nicht untersucht werden konnten. (B) Mesenterialarterien und Koronararterien sind im Hinblick auf ihre vasomotorischen Eigenschaften nur eingeschränkt vergleichbar (Kleinbongard et al., 2013b). Ob die freigesetzten Mediatoren, insbesondere Serotonin, zu einer funktionell

relevanten Beeinträchtigung der koronaren Perfusion und kardialen Kontraktilität führen, ist nicht bekannt.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die funktionellen Auswirkungen der in das koronare Aspirat freigesetzten löslichen Mediatoren auf die koronare Mikrozirkulation und die kardiale Kontraktilität im Rattenherz-Bioassay zu untersuchen. Die Verwendung von epikardialen Koronararterien der Ratte ermöglicht die Untersuchung von Aspirat-Plasma-induzierten Effekten in der koronaren Makrozirkulation. Die Verwendung eines isoliert perfundierten Rattenherz-Bioassays erlaubt erstmals die Registrierung von Aspirat-Plasma-induzierten funktionellen Auswirkungen auf die koronare Mikrozirkulation und Herzfunktion. Teilziele dieser Arbeit sind:

1. Untersuchung der Aspirat-Plasma-induzierten Effekte in isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte. Vorherige Untersuchungen erfolgten bisher ausschließlich an Mesenterialarterien der Ratte; die Verwendung von Koronararterien soll nachweisen, ob die während einer Stentimplantation freigesetzten löslichen Mediatoren, vordergründig Serotonin, auch im kardialen Perfusionsgebiet Effekte auf die Vasomotion haben.
2. Etablierung eines isoliert perfundierten Rattenherz-Bioassays nach Langendorff und Untersuchung von Auswirkungen der Aspirat-Plasma-induzierten Effekte auf die koronare Mikrozirkulation und kardiale Kontraktilität.
3. Skalierung der Aspirat-Plasma-induzierten Effekte im isoliert perfundierten Rattenherz-Bioassay: Infusion von peripher-venösem Plasma von gesunden Kontrollpersonen, das mit exogenen Serotonin versetzt wurde.
4. Pharmakologische Inhibition der Aspirat-Plasma induzierten Effekte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analog-/Digitalwandler:

PowerLab 8/30

AD Instruments, Spechbach,
Deutschland

Aortenkanüle für Rattenherzen IH-SR

Hugo Sachs, March Hugstetten,
Deutschland

Ballonexpandierbare Bare Metall Stents:

Bx Sonic

Cordis Corporation, Miami, USA

Genious Magic

Eurocor GmbH, Bonn, Deutschland

Lekton

Biotronic SE & CoKG, Berlin,
Deutschland

Basic Unit ICH-SRL

Hugo Sachs, March-Hugstetten,
Deutschland

Blutgasanalyse Gerät ABL 510

Radiometer, Copenhagen, Dänemark

Datenaufnahme und –auswertung:

LabChart

AD Instruments, Spechbach,
Deutschland

Distales Embolie Schutz System:

TriAktiv SVG/3.5-FX-catheter,

Kensey Nash Corporation, Exton, USA

Druckaufnehmer DPT-6000

CODAN, Forstinning, Deutschland

Druckwandler APT300 für PLUGSYS

Hugo Sachs, March-Hugstetten,
Deutschland

Druckwandler Verstärker Modul (TAM-A)

Hugo Sachs, March-Hugstetten,
Deutschland

Druckwandler Verstärker Modul (TAM-D)

Hugo Sachs, March-Hugstetten,
Deutschland

Edelstahldraht (25 µm)

Danish Myo Technology, Aarhus,
Dänemark

Kleingefäßmyograph 510 A & 610 M

AD Instruments, Spechbach,
Deutschland

Mikrofederschere

Aesculab AG, Tuttlingen, Deutschland

Mikropinzette

Aesculab AG, Tuttlingen, Deutschland

PCGU 1000 2 MHz USB Funktionsgenerator

Velleman, Gavere, Belgien

pH-Elektrode Blue Line 15 pH

Schott Instruments, Mainz, Deutschland

Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Programmierbare Spritzenpumpe Alladin	WPI, Sarasota Florida, USA
Roller Pumpe Reglo Digital	ISMATEC, Wertheim, Deutschland
Reinstwasser Anlage Milli-Q Advantage A 10	Milipore, Schwalbach, Deutschland
Stereomikroskop zur Gefäßpräparation:	
Stemi 2000	Zeis, Oberkochen, Deutschland
Thermometer Digi-Sense J-T-E-K 2 Kanal	Cole-Parmer, Vernon Hills, USA
Thermostatischer 230V/50Hz	
Zirkulator E 100 Bad Volumen 3L	Lauda-Königshofen, Deutschland
Ultraschall Flußmesser TTFM Typ 700	Transonic System Inc., Ithaca NY, USA
Waagen : 770	Kern, Balingen, Deutschland
P1000N	Mettler, Gießen, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3SR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Albumin bovine Fraction V, ph 7.0	
Standard grade, lyophil	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem GmbH , Darmstadt, Deutschland
Carbachol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
D(+)-Glucose-Monohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
ELISA Kit für die Serotonin Bestimmung	Cayman Chemical, Ann Arbor Michigan, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketanserin tartrat	Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA
Kochsalzlösung, steril	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7(H ₂ O))	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mucosal Alkalischer Schnellreiniger	Merz, Frankfurt, Deutschland

Natriumchlorid Lösung 0,9% 1000ml

Natriumchlorid (NaCl)

Natrium Hydrogencarbonat (NaHCO₃)

Natriumpyruvat

Narcoren 16g/100ml

N-omega-Nitro-L-Arginine

Methylester (L-NAME)

Pindolol

Serotonin hydrochloride (SE)

Braun, Melsungen, Deutschland

AppliChem GmbH, Darmstadt,
Deutschland

AppliChem GmbH, Darmstadt,
Deutschland

Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Merial GmbH, Hallber, Deutschland

MP Biomedicals, Ohio, USA

Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri,
USA

Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

0,45 µm Filter Type HWAP

30 µm Filter Type NY30

1ml Spritze ohne Kanüle

5ml Spritze ohne Kanüle

BP Microlance 20G Nr.1 0,9 mm X 40 mm

BP Microlance 27G Nr.20, 9 mm X 40 mm

Flexibler Plastikschauch Rollerpumpe 2.06 I.D

Flexibler Plastikschauch Rollerpumpe 2.79 I.D

Flexibler Plastikschauch T3601-13

Pharmed Schlauch POLYPRO I.D 2.0

Pipettenspitzen

Silikonschlauch 3350

Safety-Multifly Punktionskanüle 21G x 3,4 TW

S-Monovette 9 ml LH

Vlieskompressen steril, 10 cm x10 cm

Merck, Darmstadt, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Terumo Europe N.V, Leuven , Belgien

Terumo Europe N.V, Leuven, Belgien

Becton, Dickinson & Co., Drogheda,
Irland

Becton, Dickinson & Co., Drogheda,
Irland

Tygon, Charny, Frankreich

Tygon, Charny, Frankreich

Tygon, Charny, Frankreich

GILSON, Middleton, USA

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tygon, Charny, Frankreich

Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Deutschland

Sarstedt AG&Co., Nümbrecht,
Deutschland

Fuhrmann, München, Deutschland

2.1.4 *Puffer und Lösungen*

Modifizierter Krebs-Henseleit Puffer für isolierte Koronararterien der Ratte

119,00 mmol/l	NaCl
4,70 mmol/l	KCl
2,50 mmol/l	CaCl ₂
1,17 mmol/l	MgSO ₄
25,00 mmol/l	NaHCO ₃
1,20 mmol/l	KH ₂ PO ₄
0,0027 mmol/l	EDTA
5,50 mmol/l	C ₆ H ₁₂ O ₆

Modifizierter Krebs-Heinseleit Puffer für das isoliert perfundierte Rattenherz

Puffer 1 (100%)

118,00 mmol/l	NaCl
4,70 mmol/l	KCl
2,00 mmol/l	CaCl ₂
1,60 mmol/l	MgSO ₄ x 7(H ₂ O)
25,00 mmol/l	NaHCO ₃
1,18 mmol/l	KH ₂ PO ₄
5,60 mmol/l	C ₆ H ₁₂ O ₆
2,00 mmol/l	Natrium Pyruvat
± 100 µmol/l	L-NAME

Puffer 2 (120%)

135,00 mmol/l	NaCl
5,64 mmol/l	KCl
2,40 mmol/l	CaCl ₂
1,97 mmol/l	MgSO ₄ x 7(H ₂ O)
29,86 mmol/l	NaHCO ₃
1,42 mmol/l	KH ₂ PO ₄
6,60 mmol/l	C ₆ H ₁₂ O ₆
2,40 mmol/l	Natrium Pyruvat
± 100 µmol/l	L-NAME

Die modifizierten Krebs-Henseleit Puffer (KHP) wurden durch kontinuierliche Carbogengaseinleitung (95% CO₂ und 5% O₂) bei 37°C auf einen pH von 7,4 eingestellt. 2,0 mmol/l CaCl₂ wurde nach 30 min Begasung mit Carbogen hinzugegeben. KHP für das isoliert perfundierte Rattenherz Bioassay wurden über einen 0,45 µm Membranfilter

filtriert. Die Filtration der bovinen Albumin-Stammlösung erfolgte über einen 30 µm Nylonmembran Filter.

Bovines Albumin-Stammlösung 21,6% (216 g/l) für das isoliert perfundierte Rattenherz

Bovines Albumin Fraktion V	216 g/l
H ₂ O	1l
Ca ²⁺	2,16 mmol/l
Mit NaOH auf pH =	7,4 eingestellt

Exogenes Serotonin

100 µmol/l Stammlösung, Serotonin Hydrochlorid in H₂O gelöst

Serotoninrezeptor-Antagonisten Stammlösungen

100 µmol/l Stammlösung, Ketanserin in H₂O gelöst

100 µmol/l Stammlösung, Pindolol in H₂O gelöst

2.2 Methoden

2.2.1 Studien Kohorte

2.2.1.1 Patienten

Verwendet wurde Plasma von neun männlichen Patienten mit symptomatischer Angina pectoris und einer Stenose in einem Venenbypass. Hierbei handelte es sich um Restproben von koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma aus vorherigen Studien (Kleinbongard et al., 2011a, Kleinbongard et al., 2011b, Kleinbongard et al., 2013a) (Tabelle 1). Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission vor Ort bestätigt (GZ.: 05-2807; GZ.: 07-3387; GZ.: 07-3387). Eine schriftliche Aufklärung aller beteiligten Patienten liegt vor. Die Implantation von Paclitaxel freisetzenden Stents reduziert das vasomotorische Potential des Aspirat-Plasmas (Kleinbongard et al., 2011b) und aus diesem Grund wurden in den folgenden Experimenten ausschließlich Proben von Patienten verwendet, denen ein *bare metal stent* (BMS) implantiert wurde. Alle eingeschlossenen Patienten erhielten Aspirin oral (100mg/Tag) und im Rahmen der Stentimplantation 10 000 I.E unfractioniertes Heparin (Ratiopharm®, Ulm, Deutschland) intravenös. Die klinische Beurteilung der koronaren Perfusion vor und nach der Stentimplantation erfolgte mittels der *thrombolysis in myocardial infarction* (TIMI)-Klassifikation (The TIMI Study Group, 1989).

2.2.1.2 Kontrollprobanden

Gesunde Nichtraucher (10 Männer/10 Frauen) mit leerer Anamnese für chronische oder genetische Erkrankungen und ohne aktuelle Medikation (mit Ausnahme orale Kontrazeptiva bei den weiblichen Probanden) wurden auf freiwilliger Basis rekrutiert (Hildebrandt et al., 2015, Lieder et al., 2016). Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission vor Ort bestätigt (Nr. 14-5995-BO). Eine schriftliche Aufklärung und Einverständnis aller beteiligten Probanden liegt vor.

Tabelle 1: Patienten/Proben Zuordnung

	Patienten Probe: 1# 2# 3 4# 5 6# 7 8 9										} *
<u>Bioassay</u>	Weiße Symbole: Koronararterielles Plasma		▽▽		○●	☆☆	○●	□■	◇◆	▷▷ ◁◁	
	Graue Symbole: Koronares Aspirat-Plasma		△△								
Isolierte epikardiale Koronararterien der Ratte											
Koronararteriell	-	-	+	-	+	-	+	+	+		
Koronararteriell +L-NAME	-	-	+	-	+	-	+	+	+		
Aspirat-Plasma	-	-	+	-	+	-	+	+	+		
Aspirat-Plasma +Ketanserlin/Pindolol	-	-	+	-	+	-	+	+	+		
Aspirat-Plasma +L-NAME	-	-	+	-	+	-	+	+	+		
Aspirat-Plasma +L-NAME +Ketanserlin/Pindolol	-	-	+	-	+	-	+	+	+		
Isoliert perfundierte Rattenherzen											
Koronararteriell	+	+	+	-	-	+	+	-	+		
Koronararteriell +L-NAME	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Koronararteriell +L-NAME +Ketanserlin/Pindolol	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Aspirat-Plasma	+	+	+	-	-	+	+	-	+		
Aspirat-Plasma +L-NAME	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Aspirat-Plasma +L-NAME +Ketanserlin/Pindolol	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

* = In den Abbildungen 5, 8, 9 ist jeder Patient durch ein Symbolpaar repräsentiert. Aufgrund der begrenzten Probenmenge war es nicht möglich, alle Patientenproben gleichermaßen in beiden Bioassays zu applizieren. Probenvolumina, von denen insgesamt weniger als 10 ml vorhanden waren, wurden ausschließlich im isoliert perfundierten Rattenherz Bioassay getestet (# = Patient: 1, 2, 4, 6). Plasma Proben, von denen mindestens 10 ml vorhanden waren, wurden im isoliert perfundierten Herz und in den isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte getestet (Patient: 3, 5, 7, 8, 9). Tabelle modifiziert nach (Lieder, et al., 2016).

2.2.2 Stentimplantation und Anwendung des Aspirations-/Okklusionsschutzsystems

Die interventionelle Stentimplantation in stenosierte Venenbypässe erfolgte perkutan über den femoralarteriellen Zugangsweg. Zur Verhinderung einer distalen Embolisation von

partikulärem Plaquematerial während der Stentimplantation wurde ein distales Ballon Aspirations-/Okklusionsschutzsystem (TriAktiv SVG/3.5 FXTM, Kensey Nash, Exton, USA) verwendet (Kleinbongard et al., 2011a). Die Stentimplantation erfolgte ohne vorherige Dilatation der Stenose oder mechanische Reduktion („debulking“) der Plaquemasse (Leborgne et al., 2003). Der distal der Stenose liegende Ballon wurde unmittelbar vor der Stentimplantation unter angiographischer Kontrolle mit Kontrastmittel bis zu einem Druck von 2-4 atm gefüllt und der Stent implantiert. Unmittelbar nach Implantation wurde über einen einliegenden Spül- und Aspirationskatheter die stehende Blutsäule im Bereich der Stenose aspiriert (Abbildung 2). Im Anschluss wurde der Ballon kollabiert und die Perfusion wieder freigegeben (Kleinbongard et al., 2011a, Kleinbongard et al., 2012).

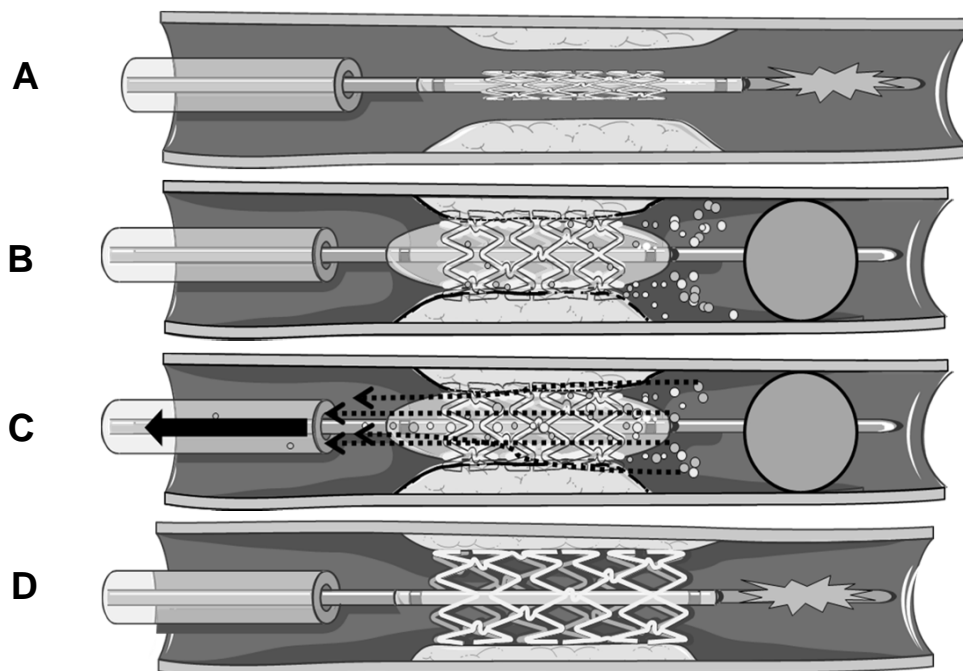


Abbildung 2: Implantation eines Stents in eine atherosklerotische Stenose unter Verwendung eines Aspirations-/Okklusionsschutzsystems .

A Vorbringen des Führungskatheters.

B Entfaltung des distalen Ballons und kurze Unterbrechung der nachgeschalteten koronaren Perfusion, anschließende Stentimplantation.

C Aspiration der stehende Blutsäule („Aspirat“) mit den freigesetzten partikulären Bestandteilen und löslichen Mediatoren über den Absaugkatheter.

D Kollabieren des Ballons und Freigabe der distalen Perfusion.

2.2.3 Blutproben

Unmittelbar vor der Stentimplantation wurde koronararterielles Blut distal der atherosklerotischen Stenose über den Aspirationskatheter gewonnen und fungierte als

Kontrolle (10-20 ml in 9 ml Heparin S-Monovetten). Das koronare Aspiratblut wurde nach erfolgter Stentimplantation gewonnen (10-20 ml in 9 ml Heparin S-Monovetten). Partikuläre, feste Bestandteile wurden mittels Filtration ex vivo über einen 40 µm Filter aus dem koronararteriellen Blut und aus dem Aspiratblut entfernt. Koronararterielles Blut und Aspiratblut wurden unmittelbar im Anschluss zentrifugiert (800 g x 10 min, 4 °C) und das separierte Plasma in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Kleinbongard et al., 2011b). Peripher-venöses Blut von freiwilligen gesunden Kontrollprobanden (n=20) wurde ohne vorherige Filtration auf gleiche Weise zentrifugiert, zusammengeführt, aliquotiert und schockgefroren. Alle Blutproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4 Bestimmung der Serotonin- und Troponinkonzentration im Plasma

Die Serotoninkonzentration in den Patientenplasmen wurde mittel eines *enzyme linked immunosorbend assays kit* (ELISA) bestimmt. Die Plasma Troponin I Messung erfolgte über ein spezifisches *two-side immunoassay* und wurde mit dem *Dimension RxL Max Integrated System* (Siemens, Deutschland) in peripher-venösen Blutproben der Patienten detektiert, welche jeweils vor der Stentimplantation und zwischen 6 bis 48 h nach der Stentimplantation gewonnen wurden (Kleinbongard et al., 2011a).

2.2.5 Tierexperimente

Alle Tierversuche wurden unter Beachtung und Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Nordrhein-Westfalen, Deutschland, genehmigt (AZ 8.84-02.05.20.11.068).

2.2.5.1 Experimente im Kleingefäß-Myographen: Isolierte epikardiale Koronararterien der Ratte

2.2.5.1.1 Experimentelle Präparation und Normalisierung der Gefäßsegmente

Sieben bis elf Wochen alte männliche Lewis Ratten mit einem Gewicht von 200-350 g wurden durch eine tiefe Enfluran-Narkose getötet. Nach Exzision des Herzens wurden unter einem Stereomikroskop drei bis sechs 2 mm lange Segmente des Ramus interventricularis anterior der linken epikardialen Koronararterie disseziert. Die Präparation der Gefäßsegmente erfolgte im oxygenierten KHP bei einer Temperatur von 4-8°C auf Eis innerhalb von maximal 30 min. Nach der Präparation wurden die Segmente im oxygenierten, KHP bei 37°C mindestens 30 min äquilibriert. In jedes präparierte Gefäßsegment wurden zwei dünne Stahldrähte (25 µm Diameter) eingeführt. Die Gefäßsegmente wurden über die einliegenden Drähte in einen Kleingefäß-Myographen eingespannt, wobei ein Draht mit einem mechanoelektrischen Kraftmesser und der

andere Draht mit einer Mikrometerschraube verbunden wurde. Verwendet wurde ein Kleingefäß-Myograph, der die simultane Messung von 4 Gefäßsegmenten ermöglichte (Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark, Abbildung 3).

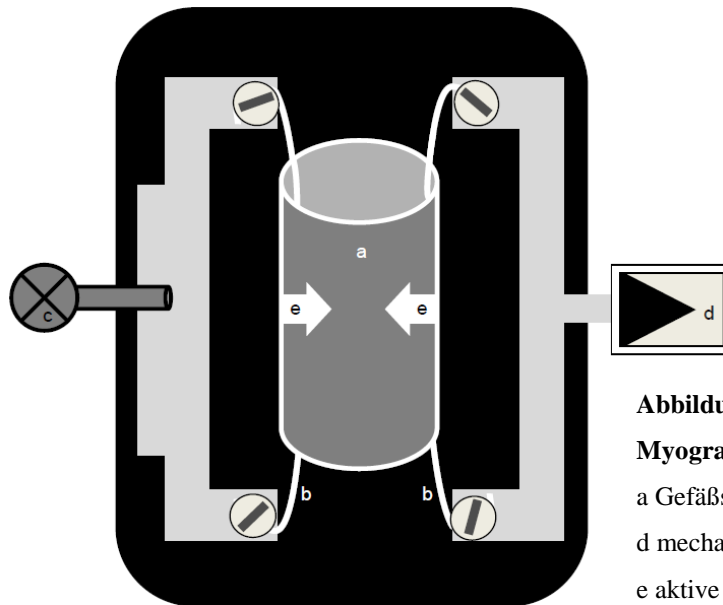


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Kleingefäß-Myographen

a Gefäßsegment; b 25 µm Draht; c Mikrometerschraube;
d mechanoelektrischer Kraftmesser;
e aktive Kraftentwicklung (Vasokonstriktion)

Die Messung der aktiven Kraftentwicklung der Gefäßsegmente als Maß der Vasomotion erfolgte in mN. Vor jedem Experiment wurde der *ex vivo* Lumendiameter eines jeden Gefäßsegments über einen vom Hersteller automatisierten Normalisierungsprozess einem *in vivo* inneren Lumendiameter angenähert, der dem inneren Lumendiameter (d) entspricht, den ein jedes Gefäßsegment im relaxierten Zustand bei einem transmuralen Druck (P) von 100 mmHg in Übereinstimmung mit dem La-Place Gesetz für Gefäße mit unendlich dünnen Wänden $P = 2 T / d$ (T = Wandspannung) hätte („d-100“). Die Gefäßsegmente wurden nach Ermittlung des d-100 auf einen Diameter von $0,9 \times d-100$ eingestellt. Es folgte eine Äquibrierungsphase von 30 min mit mehrmaligem Pufferwechsel, bevor die maximale rezeptorunabhängige aktive Kraftentwicklung eines jeden Gefäßsegments durch wiederholte Depolarisierung mittels KCl Applikation getestet wurde (zweimalige Applikation von KCl $0,6 \times 10^{-1}$ mol/l für 5 min, und anschließende einmalige Applikation von $1,2 \times 10^{-1}$ mol/l, jeweils im Abstand von 15 min und mehrmaligem Pufferwechsel). Die letzten 5 min der Äquibrierungsphase wurden als Baseline definiert. Nach einer durch Applikation von 3×10^{-6} mol/l Serotonin ausgelösten Vorkonstriktion wurde die endothelabhängige Vasodilatation mittels Zugabe von 10^{-4} mol/l Carbachol getestet. Isolierte epikardiale Koronararterien, in denen Carbachol eine durch Serotonin ausgelöste Vorkonstriktion nicht um mindestens 60% reduzierte, wurden von allen weiteren Experimenten ausgeschlossen (Tabelle 2, Anhang). Lumendiameter, maximale rezeptorunabhängige aktive Kraftentwicklung und die endothelabhängige Reduktion einer

Serotonin-induzierten Vorkonstriktion waren vergleichbar zwischen allen experimentellen Gruppen (Tabelle 2, Anhang). Die Lumendiameter Bestimmung erfolgte im Rahmen des automatisierten Normalisierungsprozesses durch den Mulvany Myographen (Mulvany and Halpern, 1977). Gefäßsegmente, in denen eine endotheliale Dysfunktion simuliert werden sollte, wurden im Anschluss an die Vasomotionstestung für 15 min mit einem KHP inkubiert, der den Stickstoffmonoxid Synthase (NOS) Inhibitor L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} mol/l) enthält. Die serotoninvermittelte Vasokonstriktion wurde in einem Teil der Experimente durch Hinzugabe der Serotoninrezeptor-Antagonisten Ketanserin (5-Hydroxytryptamine [5-HT] $_{2A/2C}$ Rezeptor Blocker mit α 1-Adrenorezeptor Blocker Effekten, 10^{-7} mol/l) und Pindolol (β -Adrenorezeptor Blocker mit [5-HT] $_{1A/1B}$ rezeptorantagonistischen Effekten, 10^{-7} mol/l) aufgehoben. Eine durch exogene Serotonin Gabe ausgelöste Vasokonstriktion (10^{-10} bis 10^{-4} mol/l) konnte durch die hier verwendeten Ketanserin- und Pindololkonzentrationen aufgehoben werden. Die Gefäßsegmente wurden anschließend für 8 min mit koronararteriellem Plasma oder Aspirat-Plasma inkubiert (Verdünnung 1:5), die maximale Vasokonstriktion als aktive Kraftentwicklung (in mN) gemessen und relativ zur Baseline (Δ mN) und als prozentualer Anteil der maximal durch KCl-induzierten Vasokonstriktion ($\% \text{ KCl}_{\text{max}} = 100 \%$) dargestellt (Lieder et al., 2016, Kleinbongard et al., 2011a). In einer weiteren Versuchsreihe wurde exogenes Serotonin in kumulativen Dosen (1×10^{-10} mol/l bis 1×10^{-4} mol/l) zu den Gefäßsegmenten (\pm L-NAME) hinzugegeben und eine Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt, anhand derer die Aspirat-Plasma-induzierten Effekte skaliert wurden.

2.2.5.1.2 Isolierte Gefäße: Versuchsprotokolle

Alle Gefäßsegmente wurden einer Äquibrilierung von 30 min unterzogen und anschließend die Vasomotion getestet. Anschließend wurden folgende Versuchsprotokolle durchgeführt:

1. KHP: Inkubation mit koronararteriellem Plasma
2. KHP: +L-NAME: Inkubation mit koronararteriellem Plasma
3. KHP: Inkubation mit Aspirat-Plasma
4. KHP +L-NAME: Inkubation mit Aspirat-Plasma
5. KHP +Ketanserin/Pindolol: Inkubation mit Aspirat-Plasma
6. KHP +L-NAME + Ketanserin/Pindolol: Inkubation mit Aspirat-Plasma
7. KHP: Kumulative Applikation von exogenem Serotonin
8. KHP +L-NAME: Kumulative Applikation von exogenem Serotonin

2.2.5.2 *Isoliert perfundiertes Rattenherz*

2.2.5.2.1 *Herzpräparation*

7-11 Wochen alte männliche Lewis Ratten mit einem Gewicht von 200-350 g wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos, Germany, 800 mg/kg) narkotisiert und in tiefer Narkose durch entbluten getötet. Mit dem Pentobarbital zusammen wurden 1500 IU unfraktioniertes Heparin injiziert, um einer Koagelbildung während der Herzpräparation vorzubeugen. Eine bilaterale Thorakotomie wurde durchgeführt, das Herz zügig exziiert und an einer Langendorff-Apparatur kanüliert. Die Herzpräparate wurden konstant mit einem Perfusionsdruck (Aorten Druck = AD) von 65-70 mmHg perfundiert und der über eine Wassersäule eingestellte Perfusionsdruck kontinuierlich aufgezeichnet. Nach einer initialen Perfusion mit KHP (100%) für 3 min wurde auf einen höher konzentrierten KHP (120%, \pm L-NAME) umgeschaltet (siehe Material und Methoden). In den Pufferstrom von Puffer 2 wurde über eine zweite Pumpe im Verhältnis 1:5 eine Albumin-haltige Stammlösung injiziert, um eine konstante Proteinmenge von 43,2 g/l infundieren zu können. Über eine linksatriale Inzision wurde ein mit einem Druckaufnehmer verbundener Latexballon in das Cavum des linken Ventrikels geschoben und so der linksventrikuläre systolische Druck (LVD_{Sys}) sowie der linksventrikuläre diastolische Druck (LVD_{Dia}) gemessen. Der LVD_{Dia} wurde über eine Inflation des Ballons auf 5-10 mmHg eingestellt. Die Herzfrequenz wurde durch rechtsatriale elektrische Stimulation während der gesamten Versuchsdauer bei 350 ± 2 Schlägen pro min konstant gehalten. Der koronare Fluss (KF in ml/min) wurde mit einem Ultraschall Durchlaufflussmesskopf oberhalb der Aortenkanüle kontinuierlich gemessen. Während des gesamten Versuchs wurde die Temperatur in der Aortenkanüle und auf der Herzoberfläche registriert und die Perfusatemperatur konstant bei 37°C gehalten. Nach Kanülierung und Instrumentierung wurden alle isolierten Herzen einer Stabilisierungsphase von 20 min unterzogen.

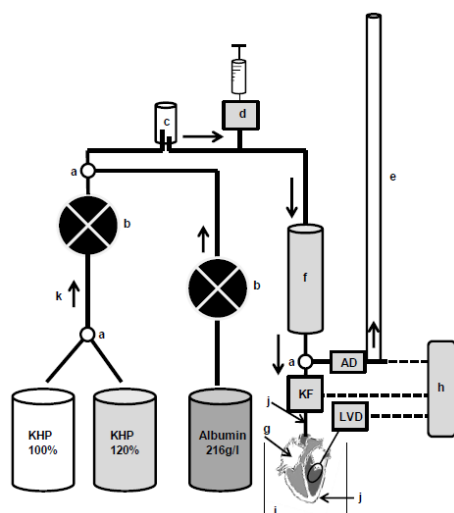


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Langendorff-Apparatur

a Dreiwege-Ventil; b Rollerpumpe;
c Windkessel; d Spritzenpumpe; e Steigrohr zur Perfusionsdruckkontrolle; f Doppelwandige geheizte Glasspirale; g Elektrode für atriale elektrische Stimulation; h Computer; i Doppelwandige geheizte Organkammer aus Glas; j Temperatursonde; k Flussrichtung; KF Koronare Flussmessung; LVD Messung der linksventrikulären Drücke mittels Ballonkatheter; AD Aortendruckmessung

Präparationen mit einem KF unter 10 ml/min (-L-NAME) oder 8 ml/min (+L-NAME) und einem linksventrikulärem Differenz Druck ($LVDD = LVD_{Sys} - LVD_{Dia}$) unter 70 mmHg (-L-NAME) oder 60 mmHg (+L-NAME) wurden von weiteren Experimenten ausgeschlossen (Tabelle 3, Anhang). Präparationen mit einem KF über 18 ml/min, einem LVDD über 130 mmHg, oder einer länger als 3 min andauernden Arrhythmie wurden ebenfalls ausgeschlossen (Bell et al., 2011). Das Ende der Stabilisierungsphase war erreicht, wenn die Schwankungen der Messparameter in einem Bereich von ± 0.4 ml/min für KF und für LVDD ± 5 mmHg lagen. Anschließend wurden KF und LVDD über 4 min aufgezeichnet, gemittelt und als Baseline definiert und bildeten die Bezugsgröße für alle weiteren Berechnungen. Im Anschluss wurden Plasma Aliquots (2ml) mit einer Spritzenpumpe mit 2 ml/min vor dem Wärmetauscher in den Pufferstrom infundiert. Die Plasma Verdünnung (1:6.4), Zeitpunkt und Dauer der Infusion sind in Vorversuchen optimiert worden. Perfusionsdruck, pH und Sauerstoffsättigung des Perfusats wurde durch die Plasmainfusion nicht verändert. Minima und Maxima (min/max) in KF und LVDD nach Plasmainfusion wurden innerhalb eines Zeitfensters von 5 min aufgezeichnet. Peripher-venöses Plasma von gesunden Kontrollpersonen wurde mit aufsteigenden Konzentrationen von exogenem Serotonin (0; 0,5; 1; 3; 6 $\mu\text{mol/l}$) versetzt und in den Pufferstrom des modifizierten KHP infundiert. 0,5 $\mu\text{mol/l}$ entspricht der mittleren Serotoninkonzentration im koronararteriellen Plasma von Patienten. 1 $\mu\text{mol/l}$ und 3 $\mu\text{mol/l}$ entsprechen dem Bereich der im Aspirat-Plasma gemessenen Serotoninkonzentrationen. Um den Effekt der in vivo Serotoninkonzentration im koronaren Blut besser abschätzen zu können, wurde zusätzlich eine exogene Serotoninkonzentration gewählt (6 $\mu\text{mol/l}$), die um den Verdünnungsfaktor (1:6.4) in der Langendorff-Apparatur korrigiert wurde. Alle Werte wurden als Absolutwerte dargestellt und als Δ relativ zum Mittelwert der Baseline berechnet (Δ min/max) (Abbildung 8). Ein Teil der Experimente wurden unter NOS Inhibition und mit Serotoninrezeptor-Antagonisten wiederholt. Hierbei wurden die gleichen Konzentrationen wie in den isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte verwendet. In Vorversuchen konnte eine durch exogenes Serotonin (30 $\mu\text{mol/l}$) in isoliert perfundierten Rattenherzen (+ L-NAME) induzierte Vasokonstriktion vollständig aufgehoben werden (siehe Anhang, Abbildung 1).

2.2.5.2.2 Isoliert perfundiertes Rattenherz: Versuchsprotokolle

Jedes isoliert perfundierte Herz wurde einer Stabilisierungsphase von 20 min unterzogen (\pm L-NAME und \pm Ketanserin/Pindolol). Folgende Versuchsprotokolle wurden durchgeführt:

1. -L-NAME: Infusion von koronararteriellem Plasma
2. +L-NAME : Infusion von koronararteriellem Plasma
3. +L-NAME +Ketanserin/Pindolol: Infusion von koronararteriellem Plasma

4. -L-NAME: Infusion von Aspirat-Plasma
5. +L-NAME: Infusion von Aspirat-Plasma
6. +L-NAME + Kentanserin/Pindolol: Infusion von Aspirat-Plasma
7. -L-NAME: Infusion von Kontrollprobanden Plasma versetzt mit exogenem Serotonin (0; 0,5; 1; 3; 6 $\mu\text{mol/l}$)
8. + L-NAME: Infusion von Kontrollprobanden Plasma versetzt mit exogenem Serotonin (0; 0,5; 1; 3; 6 $\mu\text{mol/l}$)

2.3 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. In den isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte wurde die Testung der Vasomotion mittels Ein-Weg-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Die Vasokonstriktion, induziert durch Exposition gegenüber koronararteriellem Plasma, Aspirat-Plasma und exogenem Serotonin, wurde mittels Zwei-Wege-ANOVA mit wiederholten Messungen mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Die Troponin I Konzentration im Patientenplasma vor und nach Stentimplantation, Baseline Parameter der isoliert perfundierten Rattenherzen, Serotoninkonzentrationen im koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma, Veränderungen in KF und LVDD in isoliert perfundierten Rattenherzen induziert durch Infusion von koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma und mit exogenem Serotonin versetzten peripher-venösem Plasma von gesunden Kontrollprobanden, wurden mittels *Ein-Weg-ANOVA* mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Bivariate Assoziationen zwischen kontinuierlichen Variablen wurden mit dem Pearson Korrelationskoeffizienten verglichen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten wurden bei $P < 0.05$ angenommen. Alle statistischen Tests wurden mit der Software Sigma Stat 3.5 (Systat Software inc., San Jose, USA) durchgeführt

3 Ergebnisse

3.1 Patienten Charakteristika

Alle Patienten haben eine langjährige positive Anamnese für eine koronare Herzerkrankung und erhielten erstmalig eine Stentimplantation in einem atherosklerotisch degenerierten Venenbypass (für Patienten Charakteristika siehe Tabelle 1, Anhang). Der TIMI Flow war II in 5 und III in 4 Patienten vor der Stentimplantation und III in 9 Patienten nach der Stentimplantation. Troponin I war $0,03 \pm 0,01$ ng/ml vor und $0,48 \pm 0,27$ ng/ml ($P < 0.05$) im Maximum nach der Stentimplantation. In zwei von neun Patienten überschritt der Troponin Anstieg nach Stentimplantation den *cut-off level* von $0,15 \mu\text{g/ml}$,

sodass bei diesen Patienten wahrscheinlich eine myokardiale Ischämie vorgelegen hat (Thygesen et al., 2012). Die Serotoninkonzentration im koronararteriellem Plasma stieg von $0,4 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$ auf $1,9 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ ($P < 0,01$) im Aspirat-Plasma nach Stentimplantation an (Abbildung 5).

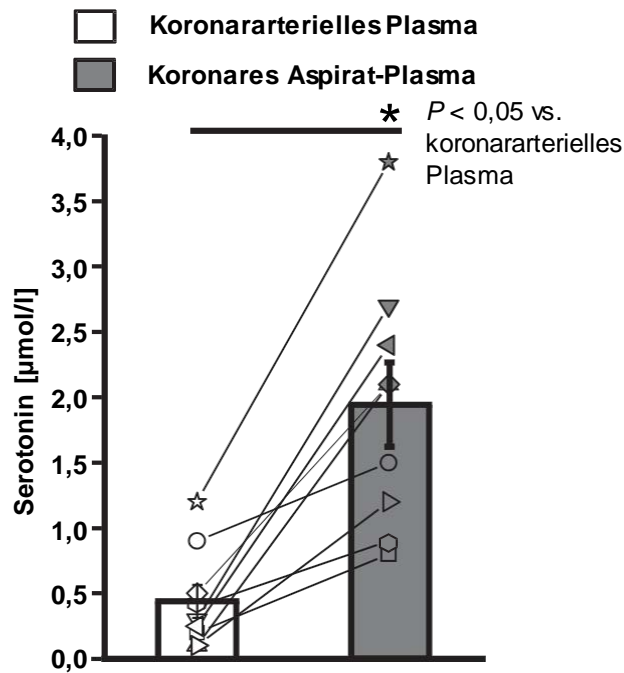


Abbildung 5: Anstieg der Serotoninkonzentration im koronaren Aspirat-Plasma nach Stentimplantation
 Statistischer Vergleich mittels Zwei-Wege ANOVA mit wiederholten Messungen mit Bonferroni-Korrektur.
 Modifiziert nach Lieder et al., 2016.

3.2 Isolierte epikardiale Koronararterien der Ratte

3.2.1 Plasma-induzierte Vasokonstriktion

Die Inkubation mit koronararteriellem Plasma induzierte in isolierten Gefäßsegmenten eine Vasokonstriktion von $12 \pm 8\% \text{ KCl}_{\text{max}}$ und die Inkubation mit koronarem Aspirat-Plasma induzierte eine Vasokonstriktion von $52 \pm 8\% \text{ KCl}_{\text{max}}$. In Gefäßsegmenten mit pharmakologischer NOS Inhibition wurden sowohl die durch koronararterielles Plasma induzierte Vasokonstriktion ($24 \pm 9\% \text{ KCl}_{\text{max}}$), als auch die durch koronares Aspirat-Plasma induzierte Vasokonstriktion ($110 \pm 15\%$) verstärkt (Abbildung 6). Eine Blockade der Serotoninrezeptoren mit Ketanserin/Pindolol schwächte die Aspirat-Plasma-induzierte Vasokonstriktion ab, unabhängig von der NOS Inhibition (Abbildung 6).

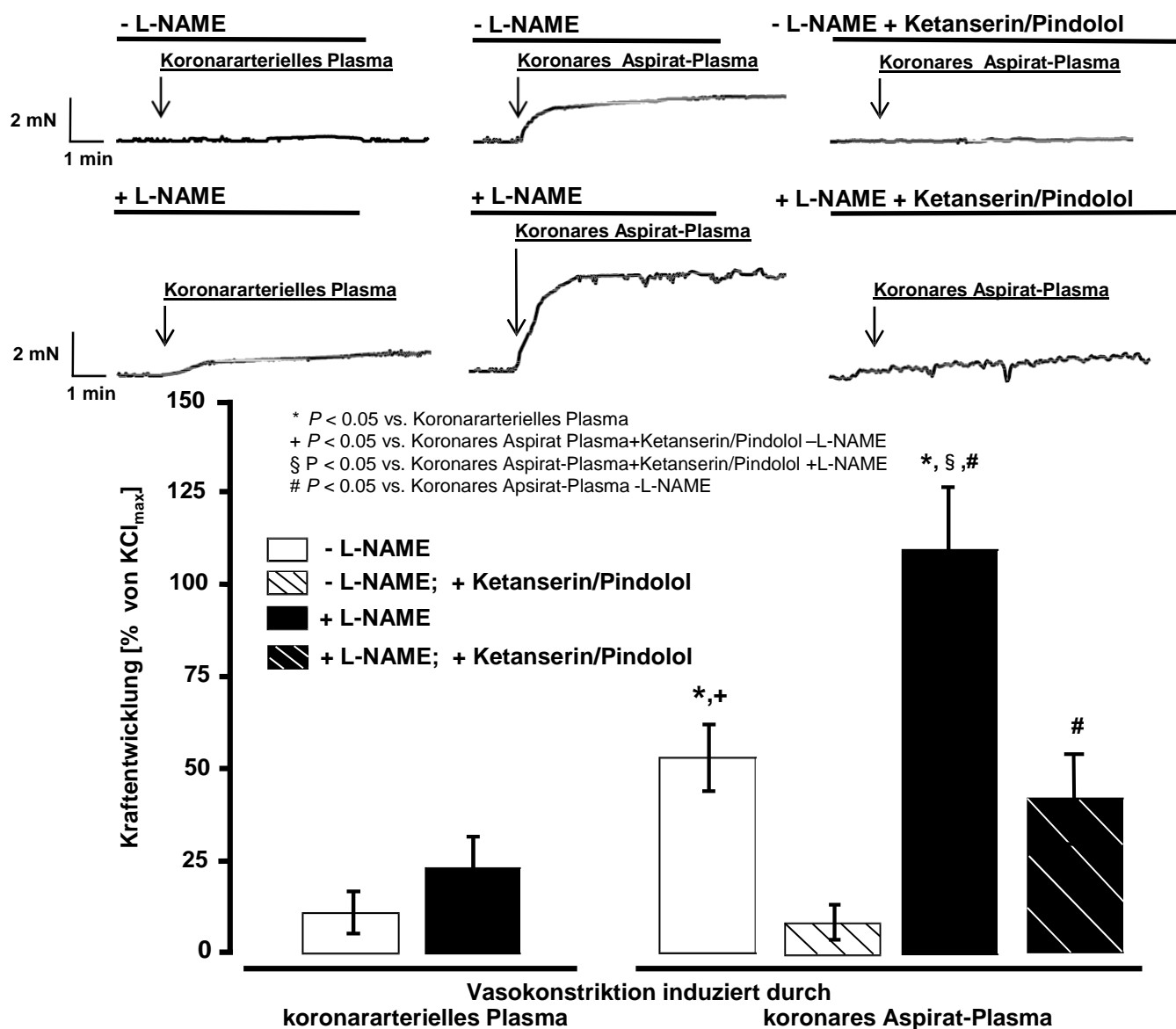


Abbildung 6: Vasokonstriktion in isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte durch Inkubation mit koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma

Oberer Hälfte der Abbildung: Den Mittelwert repräsentierende Originalregistrierungen.

Untere Hälfte der Abbildung: Vasokonstriktion, dargestellt als prozentualer Anteil der maximalen durch KCl-induzierten Vasokonstriktion. Statistischer Vergleich mittels Zwei-Wege ANOVA mit wiederholten Messungen mit Bonferroni-Korrektur. Modifiziert nach Lieder et al., 2016

3.2.2 Vasokonstriktion induziert durch exogenes Serotonin

Exogenes Serotonin, appliziert in kumulativen Dosen, induzierte in isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte (\pm L-NAME) eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion (Abbildung 7).

Eine exogene Serotoninkonzentration, die der im Aspirat-Plasma gemessenen entsprach, induzierte eine mit Aspirat-Plasma ungefähr vergleichbare Vasokonstriktion (graue Box in Abbildung 7).

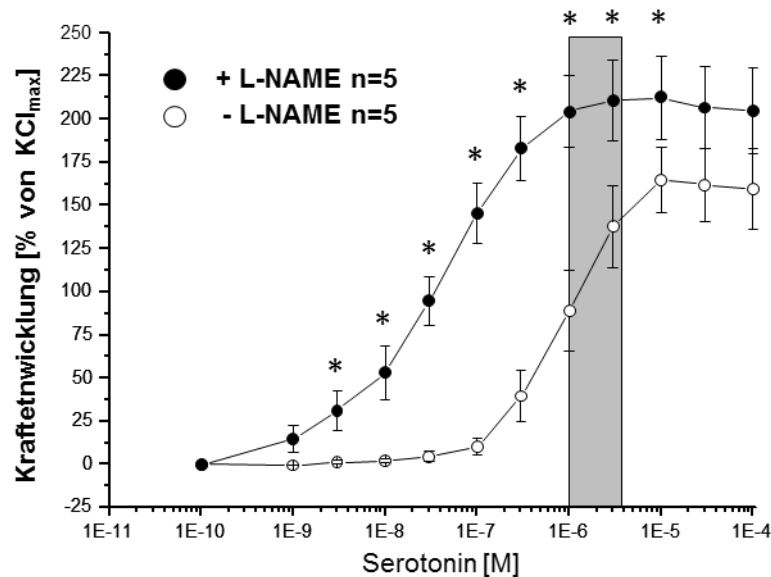


Abbildung 7: Kumulative Dosis-Wirkungskurve für eine Serotonin-induzierte Vasokonstriktion in isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte

Vasokonstriktion durch kumulative Dosen von exogenem Serotonin, dargestellt als % der maximalen durch KCl auslösbaren Vasokonstriktion. Graue Box: Serotonin-Konzentrationsäquivalent zum koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma. Statistischer Vergleich mittels Zwei-Wege ANOVA mit wiederholten Messungen mit Bonferroni-Korrektur. Modifiziert nach Lieder et al., 2016.

3.3 Isoliert perfundiertes Rattenherz

3.3.1 Koronararterielles Plasma und Aspirat-Plasma

In Herzen ohne NOS Inhibition waren die durch Plasmainfusion induzierten Veränderungen im KF und LVDD zwischen koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma nicht unterschiedlich (Abbildung 8, A und B). In Herzen mit NOS Inhibition wurden KF und LVDD durch die Infusion von koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma in unterschiedlichem Maß reduziert (Abbildung 8, A und B). Unter NOS Inhibition reduzierte eine Infusion von Aspirat-Plasma den KF und LVDD stärker als eine Infusion von koronararteriellem Plasma (koronares Aspirat-Plasma vs. koronararterielles Plasma; KF [ml/min]: 7.8 ± 0.4 vs. 9.2 ± 0.2 , $P < 0.05$, LVDD [mmHg]: 61.7 ± 4.2 vs. 75.6 ± 3.0 und CF [Δ ml/min]: -1.6 ± 0.3 vs. -0.9 ± 0.1 , $P < 0.05$, LVDD [Δ mmHg]: -20.2 ± 3.3 vs. -11.2 ± 0.9 , $P < 0.05$) (Abbildung 8, A und B). Die unter NOS Inhibition durch Infusion von Aspirat-Plasma ausgelöste Reduktion von KF und LVDD war transient und bildete sich nach der Auswaschphase zurück (Abbildung 8 A). Eine Blockade der Serotoninrezeptoren verhinderte die Aspirat-Plasma induzierte Reduktion von KF und LVDD (Abbildung 8, A und B). Die induzierten Veränderungen im KF korrelierten mit den Veränderungen im

LVDD in Herzen mit NOS Inhibition. In Herzen ohne NOS Inhibition war eine solche Korrelation nicht vorhanden (Abbildung 8 C).

3.3.2 **Korrelation zwischen der Serotoninkonzentration im Aspirat-Plasma und der Reduktion im KF und LVDD**

In Herzen ohne NOS Inhibition korrelierte die im koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma gemessene Serotoninkonzentration nicht mit den durch Plasmainfusion induzierten Veränderungen im KF und LVDD (Abbildung 9 A). Unter NOS Inhibition korrelierte die im koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma gemessene Serotoninkonzentration mit den durch Plasmainfusion induzierten Veränderungen im KF und LVDD (Abbildung 9 B). Diese Korrelation unter NOS Inhibition wurde durch eine Blockade der Serotoninrezeptoren aufgehoben (Abbildung 9 C).

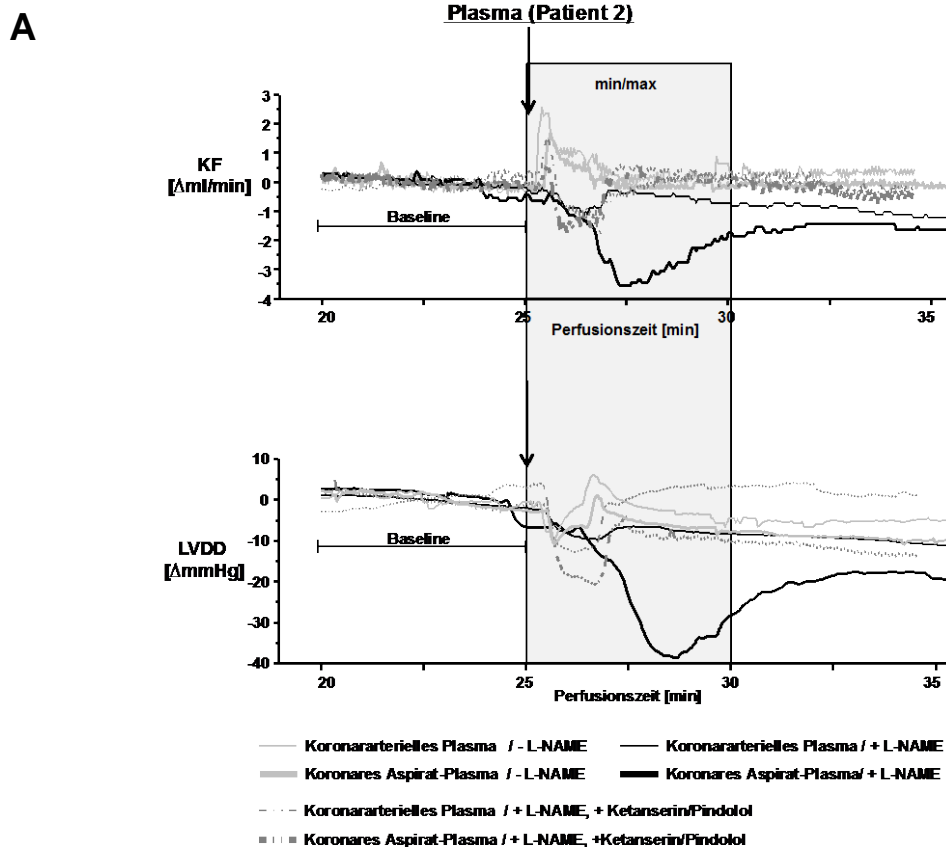


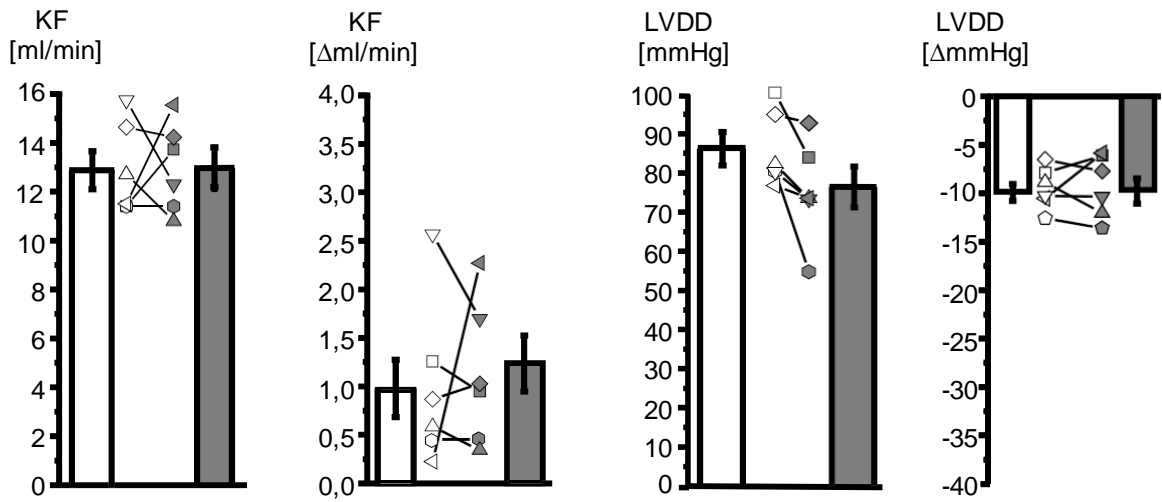
Abbildung 8, Fortsetzung nächste Seite

B

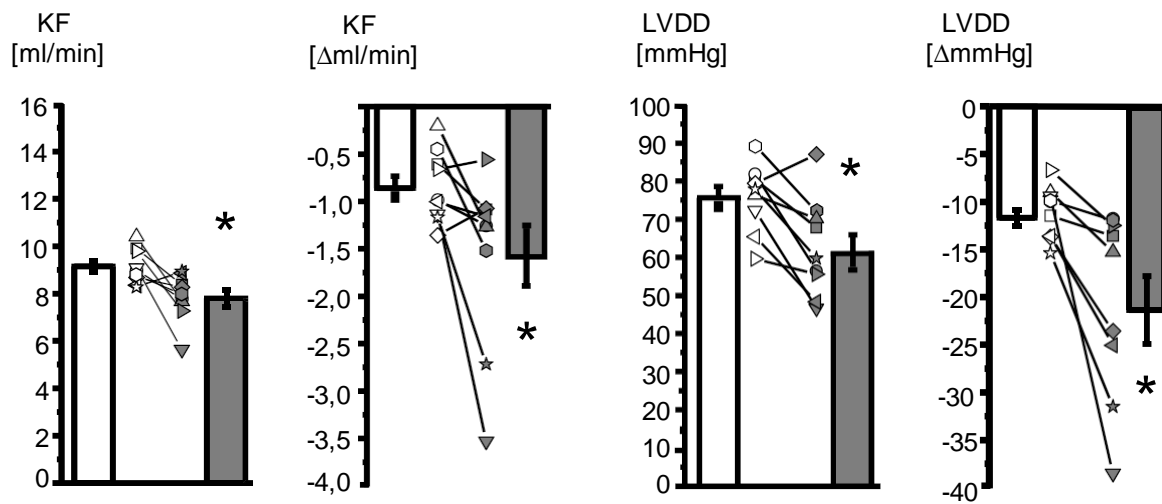
□ Koronararterielles Plasma
■ Koronares Aspirat-Plasma

* $P < 0.05$ vs. Koronararterielles Plasma

- L-NAME



+ L-NAME



+ L-NAME + Ketanserin/Pindolol

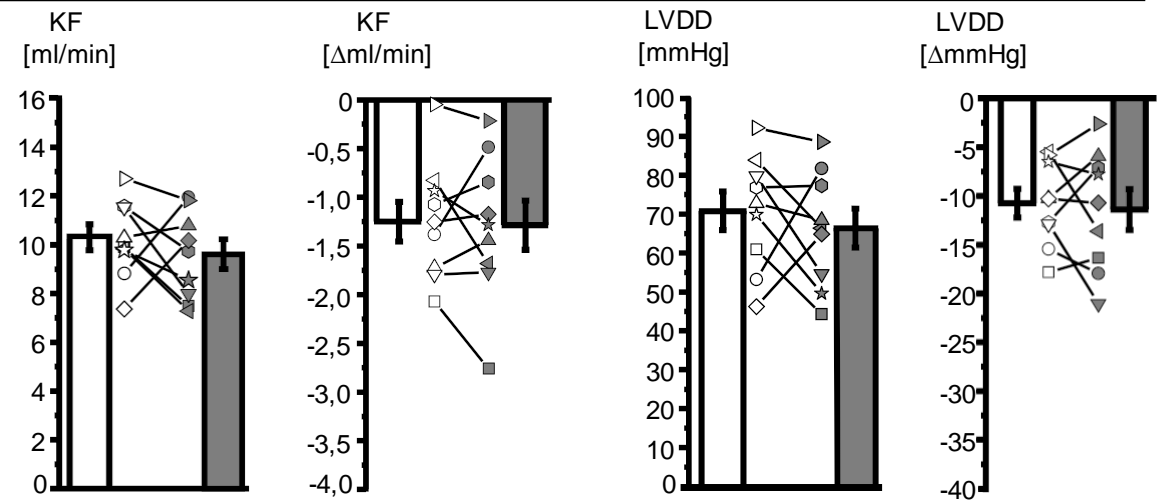


Abbildung 8, Fortsetzung

C

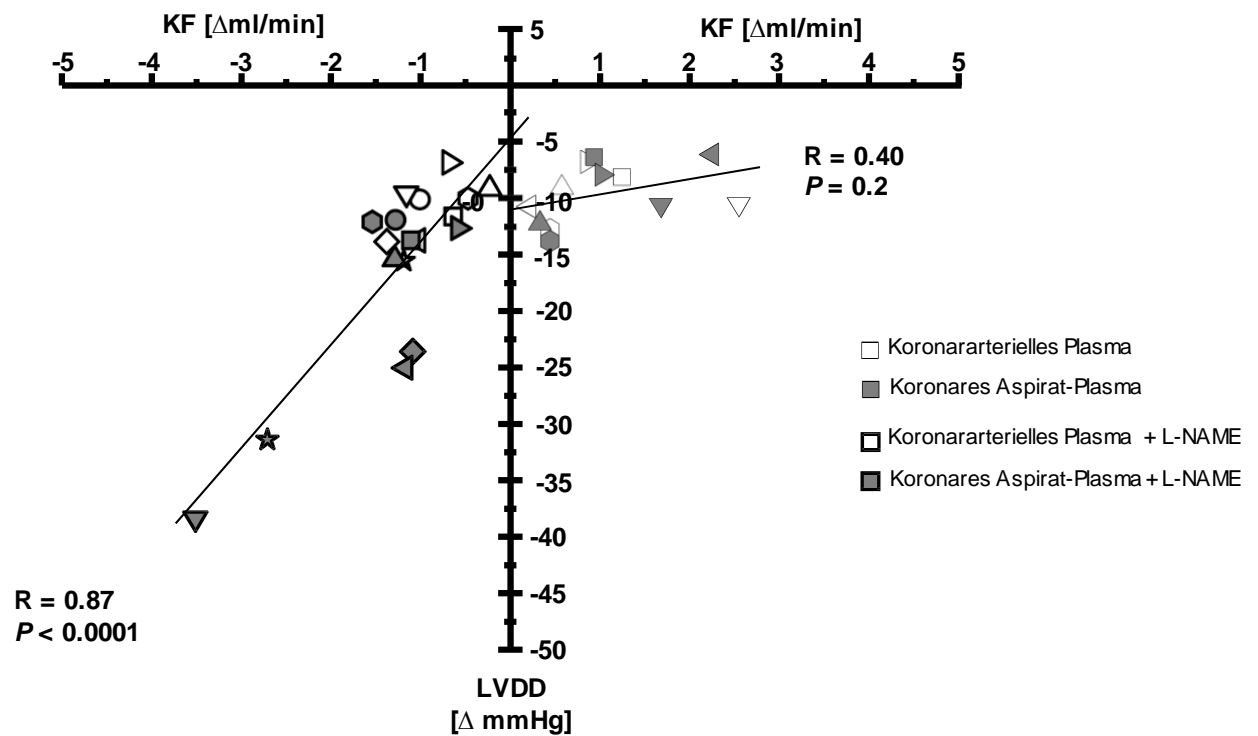


Abbildung 8: Veränderungen von KF und LVDD im isoliert perfundierten Rattenherz, induziert durch Infusion von koronararteriellem Plasma oder Aspirat-Plasma

A Original Registrierung von KF und LVDD während und nach einer Infusion von koronararteriellem Plasma und von Aspirat-Plasma (2 ml mit 2 ml/min, Verdünnungsfaktor 1:6,4) aus Patient Nr. 2, Darstellung als Δ zur Baseline. Grauer Kasten: Zeitfenster, in dem Minima und Maxima Werte für KF und LVDD ermittelt wurden.

B Einzelwerte und Mittelwerte aller ermittelten Minima und Maxima (min/max) für KF und LVDD nach Infusion von koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma. Darstellung in Absolutwerten min/max und als Δ min/max zur Baseline. Statistischer Vergleich mittels Ein-Weg ANOVA mit Bonferroni-Korrektur.

C Korrelation zwischen der KF und LVDD Reduktion (Δ min/max zur Baseline) in Herzen mit pharmakologischer NOS Inhibition nach Infusion von koronararteriellem Plasma und Aspirat-Plasma.

Modifiziert nach Lieder et al., 2016.

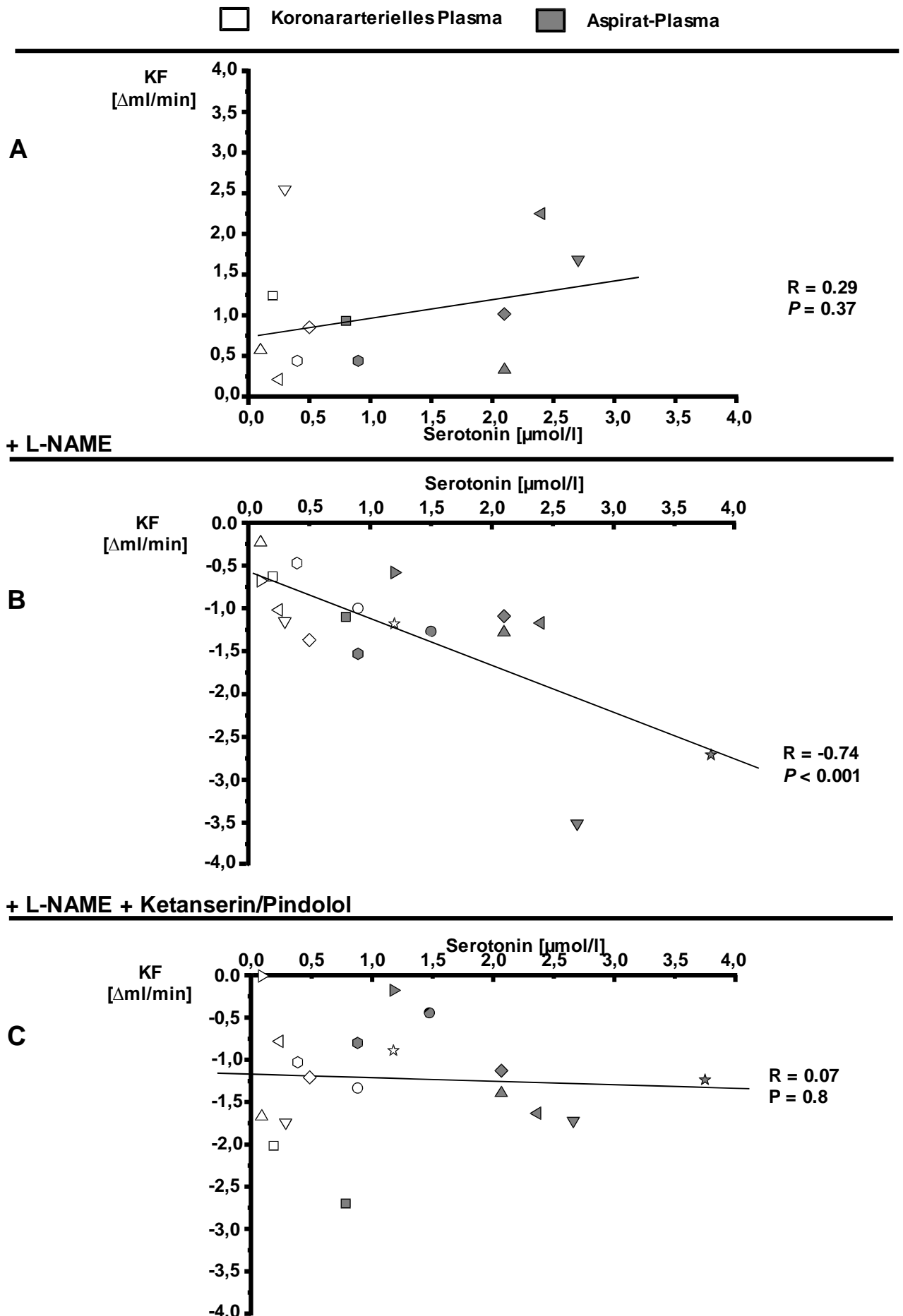


Abbildung 9: Korrelation zwischen der Serotoninkonzentration im Patientenplasma und der induzierten KF Reduktion (Δ min/max zur Baseline) in isoliert perfundierten Rattenherzen nach Plasmainfusion

A Ohne NOS Inhibition. **B** NOS Inhibition mit L-NAME. **C** NOS Inhibition mit L-NAME und Serotoninrezeptor-Antagonisten. Modifiziert nach Lieder et al., 2016.

3.3.3 Plasma von Kontrollprobanden, versetzt mit exogenem Serotonin

Die Infusion von peripher-venösem Plasma von gesunden Kontrollprobanden induzierte per se Veränderungen im KF und LVDD (\pm NOS Inhibition, Abbildung 10, A und B). Diese Veränderungen waren transient und vollständig rückläufig und KF und LVDD erreichten nach der Plasmainfusion wieder Baseline-Niveau (Abbildung 10 A und B). In Herzen ohne NOS Inhibition wurden keine serotoninkonzentrationsabhängigen Veränderungen im KF und LVDD nach Infusion von Kontrollprobanden Plasma, versetzt mit aufsteigenden Konzentrationen von exogenem Serotonin, detektiert (Abbildung 10 A). Unter NOS Inhibition konnte eine serotoninkonzentrationsabhängige Reduktion von KF und LVDD gemessen werden (Abbildung 10 B). Die Veränderungen im KF korrelierten mit den Veränderungen im LVDD in Herzen mit NOS Inhibition (Abbildung 11). In Herzen ohne NOS Inhibition war eine solche Korrelation nicht vorhanden (Abbildung 11).

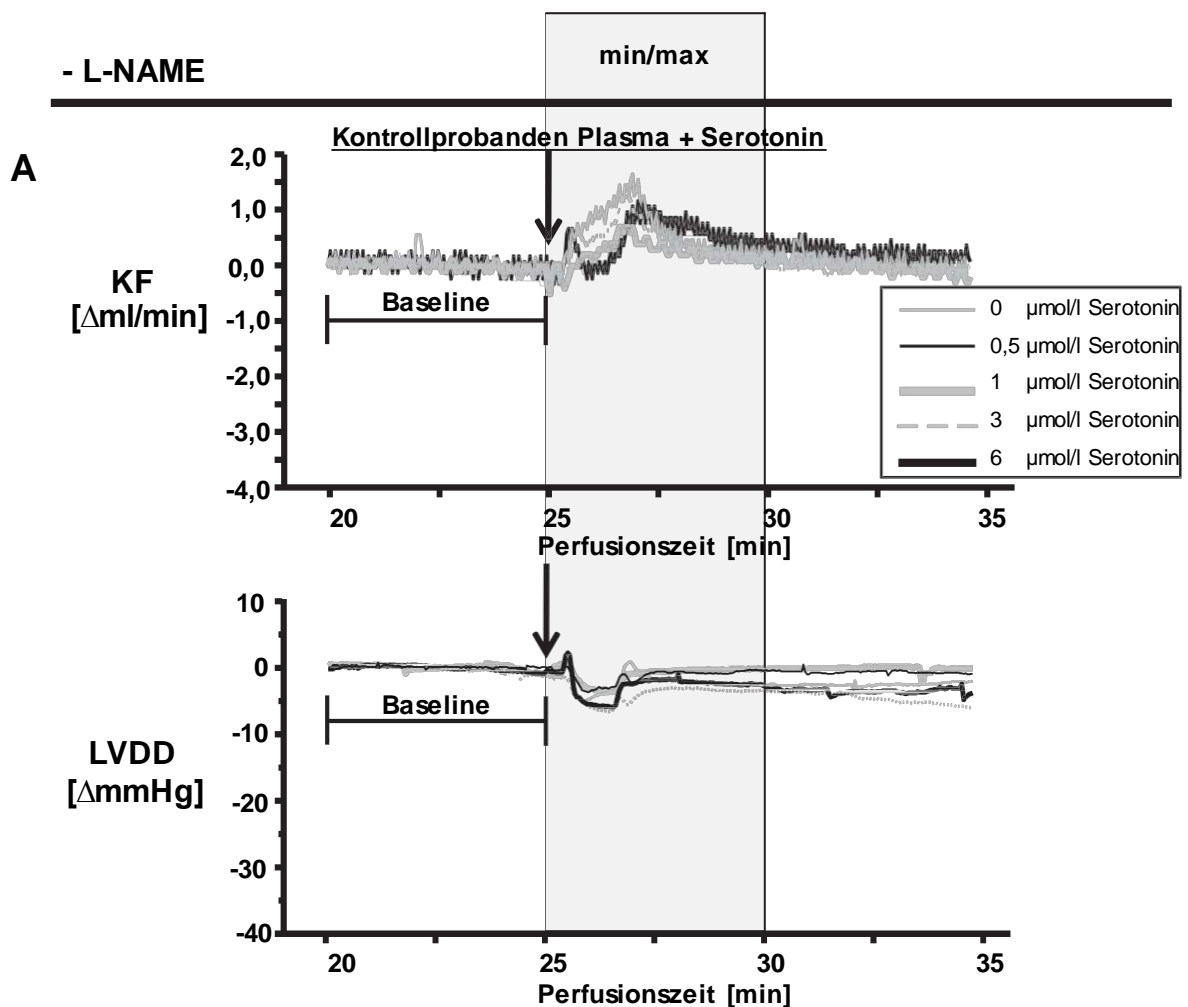


Abbildung 10, Fortsetzung nächste Seite

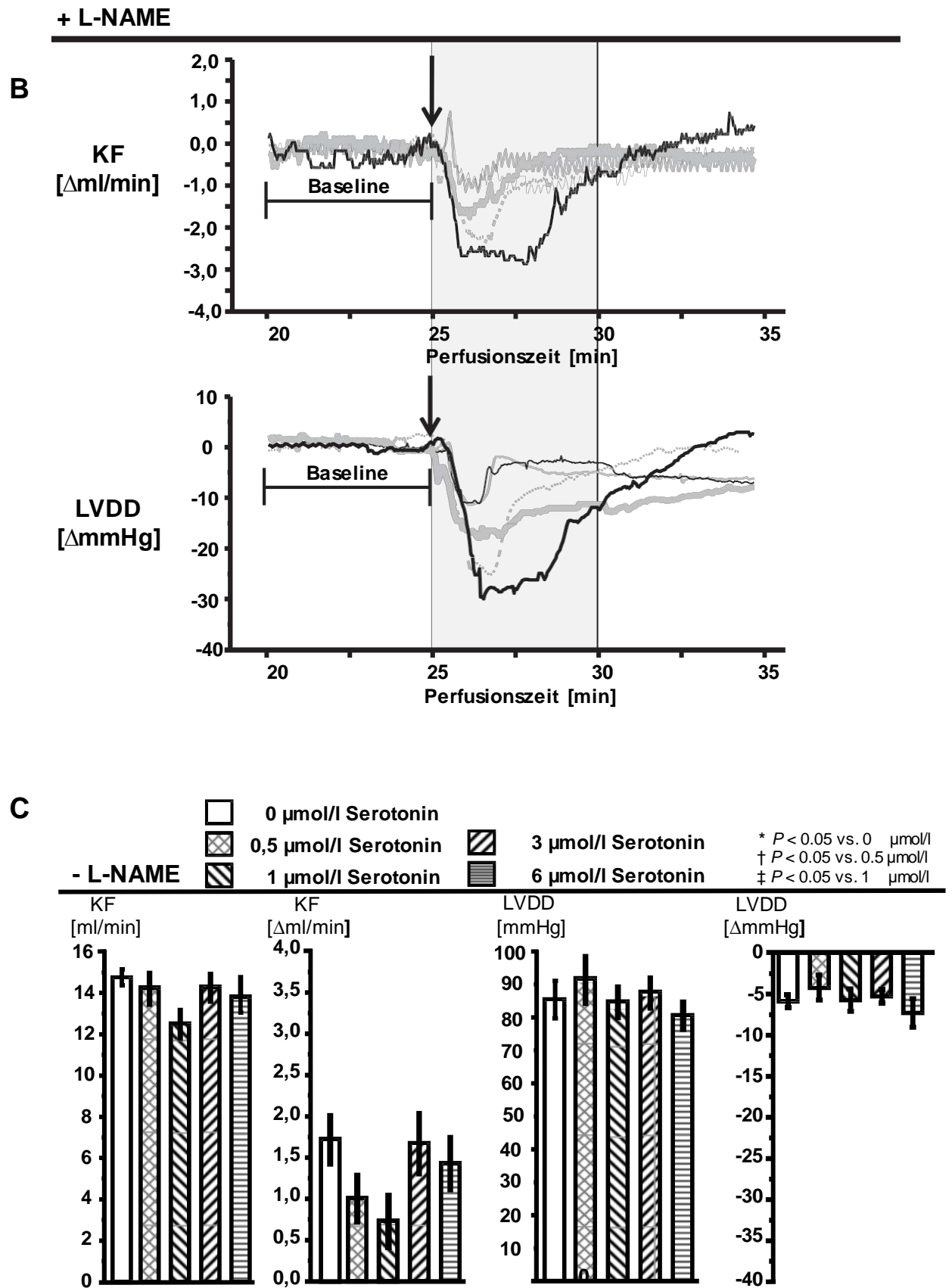


Abbildung 10, Fortsetzung nächste Seite

D

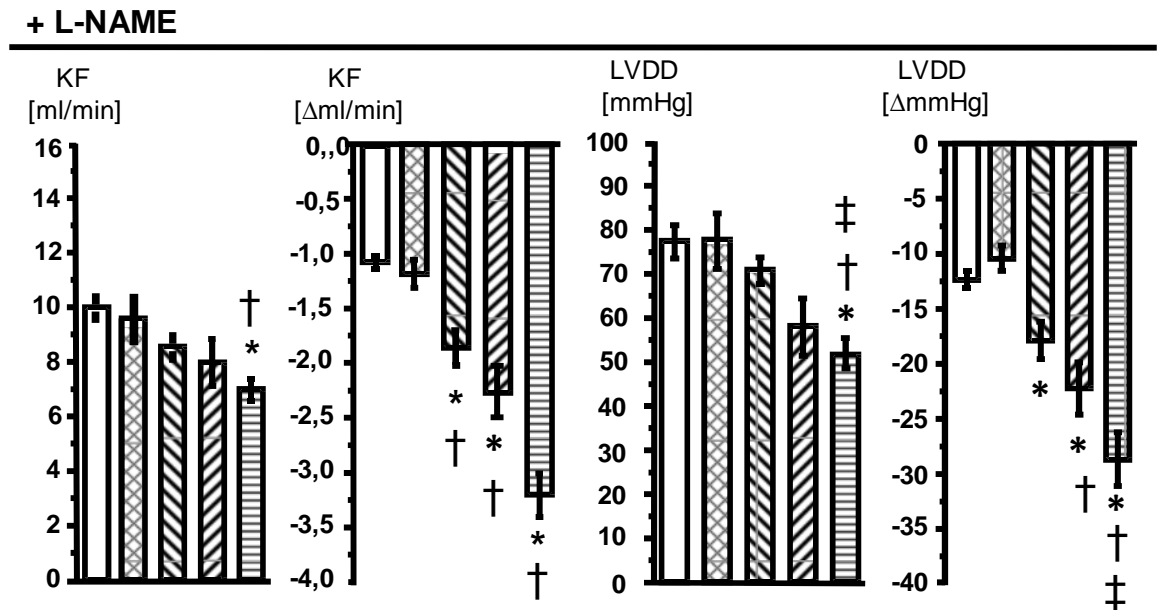


Abbildung 10: Veränderungen von KF und LVDD im isoliert perfundierten Rattenherz nach Infusion von peripher-venösem Plasma von gesunden Kontrollprobanden, versetzt mit exogenem Serotonin. Plasma mit 0,5 $\mu\text{mol/l}$ entspricht koronararteriellem Plasma mit seiner mittleren Serotoninkonzentration, 1,0 $\mu\text{mol/l}$ und 3,0 $\mu\text{mol/l}$ entsprechen den im Aspirat-Plasma gemessenen Serotoninkonzentrationen und 6,0 $\mu\text{mol/l}$ entspricht der Serotoninkonzentration korrigiert um den Verdünnungsfaktor in der Langendorff-Apparatur. Statistischer Vergleich mittels Ein-Weg ANOVA mit Bonferroni-Korrektur. Grauer Kasten: Zeitfenster, in dem Minima und Maxima (min/max) in KF und LVDD ermittelt wurden.

A und B Originalregistrierungen der Veränderungen in KF und LVDD, dargestellt als Δ zur Baseline.

A Ohne NOS Inhibition. **B** Pharmakologische NOS Inhibition mit L-NAME.

C und D Mittelwert der Minima und Maxima KF und LVDD Werte nach Plasmainfusion, dargestellt als Absolutwerte und als mittleres Δ zur Baseline. **C** Ohne NOS Inhibition. **D** Pharmakologische NOS Inhibition mit L-NAME. Modifiziert nach Lieder et al., 2016

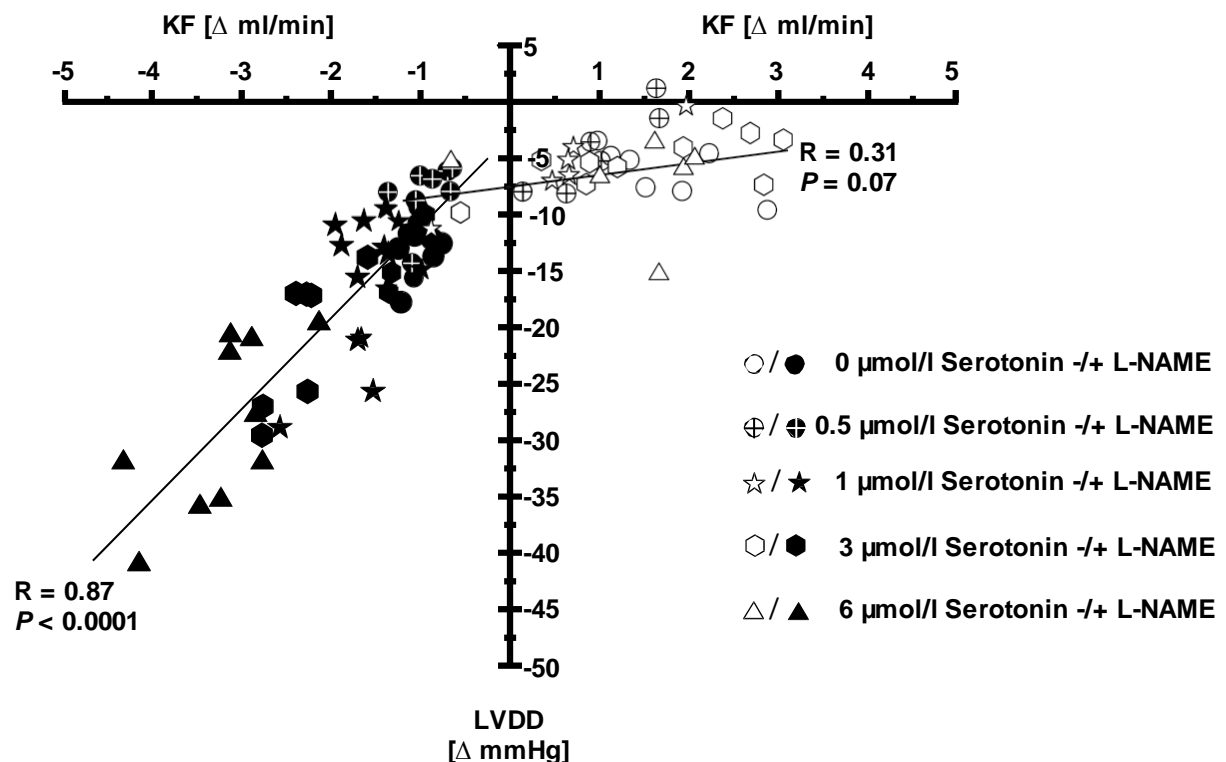


Abbildung 11: Korrelation der Veränderungen im KF und LVDD in Herzen mit und ohne NOS Inhibition nach Infusion von peripher-venösem Plasma von gesunden Kontrollprobanden, versetzt mit exogenem Serotonin. Modifiziert nach Lieder et al., 2016.

4 Diskussion

4.1 Aspirat-Plasma induziert eine Vasokonstriktion und reduziert die koronare Perfusion und linksventrikuläre Funktion

Die Serotonin-Freisetzung in diesem kleinen Patientenkollektiv war vergleichbar mit der in vorherigen Arbeiten in größeren Patientenkollektiven detektierten (Kleinbongard et al., 2011a, Kleinbongard et al., 2011b, Kleinbongard et al., 2013a). In der hier vorliegenden Arbeit konnte das vasokonstriktorisches Potential des humanen Aspirat-Plasmas erstmals in isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte und in der koronaren Mikrozirkulation in isoliert perfundierten Rattenherzen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass humanes Aspirat-Plasma nicht nur in der koronaren Zirkulation eine Vasokonstriktion induziert, sondern darüber hinaus auch akut den linksventrikulären Druck in isoliert perfundierten Rattenherzen mit pharmakologisch inhibierter NOS reduziert.

In vorherigen Untersuchungen an isolierten Mesenterialarterien der Ratte wurde der Wirkungsgrad der Aspirat-Plasma induzierten Vasokonstriktion nur geringfügig durch die endotheliale Funktionalität der präparierten Gefäßsegmente beeinflusst (Kleinbongard et

al., 2011a). Jedoch unterscheiden sich Gefäße aus unterschiedlichen vaskulären Territorien stark in ihren vasomotorischen Eigenschaften und sind daher nur eingeschränkt vergleichbar (Kleinbongard et al., 2013b). Die hier anstelle der Mesenterialarterien verwendeten isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte zeigten unter pharmakologischer NOS Inhibition eine deutlich stärkere Vasokonstriktion nach Inkubation mit Aspirat-Plasma als Gefäßsegmente ohne NOS Inhibition. Eine Vasokonstriktion war auch in isoliert perfundierten Herzen als Reduktion im KF nachweisbar, allerdings ausschließlich unter pharmakologisch induzierter endothelialer Dysfunktion durch NOS Inhibition. Eine Reduktion des LVDD, induziert durch Aspirat-Plasmainfusion, war ebenfalls nur in Herzen mit NOS Inhibition nachweisbar. Die Vasokonstriktion in Gefäßsegmenten und die Reduktion in KF und LVDD in isoliert perfundierten Herzen konnte durch eine Blockade der Serotoninrezeptoren mit Ketanserin ([5-HT]_{2A/2C}-Rezeptor-Antagonist mit α_1 -Adrenorezeptor antagonistischen Effekten) (Marwood, 1994) und Pindolol (β -Adrenorezeptor Antagonist mit [5-HT]_{1A/1B} Rezeptor antagonistischen Effekten) (Langlois et al., 1993) aufgehoben werden. Die hier verwendeten Antagonisten wirken somit nicht spezifisch an 5-HT Rezeptoren, jedoch erscheint eine über Adrenorezeptoren vermittelte Wirkung von löslichen Mediatoren im koronaren Aspirat-Plasma unwahrscheinlich: In vorherigen Studien konnte keine erhöhte Freisetzung der Mediatoren Epinephrin und Norepinephrin nach Stentimplantation im koronaren Aspirat-Plasma nachgewiesen werden (Kleinbongard et al., 2011a, Kleinbongard et al., 2013a). In den hier durchgeführten Untersuchungen korrelierten die im Patientenplasma gemessenen Serotoninkonzentrationen und die in isolierten Herzen mit NOS Inhibition induzierte KF-Reduktion. Auch dieser Befund unterstreicht die Rolle von Serotonin als Hauptmediator der hier beschriebenen Effekte. Neben Serotonin werden jedoch auch Endothelin, Thromboxan und TNF α während einer Stentimplantation in das koronare Aspirat freigesetzt (Kleinbongard et al., 2011a, Kleinbongard et al., 2012). Endothelin wird vor allem während einer Stentimplantation in nativen Koronargefäßen freigesetzt (Kleinbongard et al., 2013a), wohingegen die hier untersuchten Aspirat-Plasmen aus Interventionen in stenosierten Venenbypässen stammten. Die Mediatoren Thromboxan und TNF α hatten bereits in den vorherigen Untersuchungen an isolierten Mesenterialarterien der Ratte nur einen geringen Anteil an der Aspirat-Plasma induzierten Vasokonstriktion, sodass diese hier nicht weiter untersucht wurden (Kleinbongard et al., 2011a). Vor dem Hintergrund, dass die Aspirat-Plasma induzierten Effekte sowohl in den isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte, als auch in den isoliert perfundierten Rattenherzen unter NOS Inhibition durch Blockade der Serotoninrezeptoren aufgehoben werden konnten, erscheint Serotonin unter den in das Aspirat-Plasma freigesetzten löslichen Mediatoren als der Hauptmediator der vermittelten Vasokonstriktion. Die neben

Serotonin ebenfalls freigesetzten Mediatoren scheinen diese Vasokonstriktion nur in einer untergeordneter Funktion zu beeinflussen.

4.2 Serotonin als Hauptmediator der KF und LVDD Reduktion in isoliert perfundierten Rattenherzen

Aspirat-Plasma-induzierte Effekte wurden in den isoliert perfundierten Herzen simuliert, indem peripher-venöses Plasma von gesunden Kontrollprobanden mit exogenem Serotonin versetzt wurde. Die hier verwendeten Konzentrationen entsprachen den Serotoninkonzentrationen im Aspirat-Plasma. Alle hier untersuchten Plasmen wurden durch die Infusion in der Langendorff-Apparatur verdünnt (1:6.4). Aus technischen Gründen und aufgrund der begrenzten Probenmenge konnten keine Experimente mit unverdünntem Plasma durchgeführt werden. In einem weiteren Versuch wurde daher eine Serotoninkonzentration (6 $\mu\text{mol/l}$) verwendet, die um den Verdünnungsfaktor (1:6.4) der Langendorff-Apparatur korrigiert wurde und so die lokale, während der Stentimplantation im Patienten vorliegende Konzentration näherungsweise simulierte. Auch hier wurde eine endotheliale Dysfunktion pharmakologisch induziert, um die Verhältnisse in der atherosklerotisch veränderten koronaren Zirkulation der erkrankten Patienten nachzustellen. Unter pharmakologisch induzierter Dysfunktion war die Reduktion im KF und LVDD abhängig von der Serotoninkonzentration im infundierten Patienten- und Kontrollprobanden Plasma. Die Reduktion im LVDD scheint eine sekundäre Folge der KF-Reduktion zu sein, da Serotonin an isolierten Papillarmuskel Präparationen der Ratte keine negativ inotropen Effekte auslöst (Laer et al., 1998).

4.3 Heterogene Effekte von Serotonin in der koronaren Makro- und Mikro-zirkulation

Plasma wurde in die Herzen infundiert, die Exposition der Koronarstrombahn erfolgte somit physiologisch von intraluminal. Die Inkubation der isolierten epikardialen Koronargefäße mit Plasma erfolgte jedoch in Organbädern. Somit erfolgte die Exposition der Gefäßsegmente gegenüber Plasma überwiegend von extraluminal. Diese extraluminale, „unphysiologische“ Exposition von isolierten epikardialen Koronararterien gegenüber Aspirat-Plasma induzierte eine Vasokonstriktion und bestätigt die vorbeschriebene serotoninvermittelte Vasokonstriktion (Martin, 1994). Wie die saline Infusion von Serotonin (Mankad et al., 1991), so reduzierte auch die Infusion von serotoninhaltigem Plasma den KF in isoliert perfundierten Rattenherzen unter NOS Inhibition. In gesunden Koronargefäßen der Makro- und Mikro-zirkulation induziert Serotonin spezieübergreifend heterogene Effekte auf die Vasomotion (Martin, 1994). Die Stimulation von 5-HT₁ Rezeptoren auf einem gesunden Endothel verursacht eine Vasodilatation, welche über eine NO Freisetzung und Relaxation der glatten

Gefäßmuskelzellen vermittelt wird (Vanhoutte et al., 2009). Die Stimulation von 5-HT_{2A} Rezeptoren, exprimiert auf glatten Gefäßwandmuskelzellen, vermittelt hingegen endothelunabhängig eine Vasokonstriktion. Die serotoninvermittelten Effekte in Gefäßen sind abhängig von der Größe, dem vaskulären Territorium und der Zugehörigkeit zur Makro- oder Mikrozirkulation eines Gefäßes. So löst Serotonin in verschiedenen untersuchten Spezies eine Vasokonstriktion in epikardialen Koronararterien, zeitgleich jedoch eine Vasodilatation in der koronaren Mikrozirkulation (Martin, 1994, Bove and Dewey, 1983, Lamping et al., 1989) aus. Ursächlich für diese Heterogenität könnten unter anderem Unterschiede in der Rezeptorverteilung und Dichte in Abhängigkeit von der Gefäßgröße innerhalb eines Gefäßterritoriums sein (Martin, 1994). Die simultane Blockade der 5-HT₁ und 5-HT₂ Rezeptoren mit Ketanserin und Pindolol in den hier durchgeführten Experimenten erlaubte jedoch keine Unterscheidung der rezeptorspezifischen Effekte der 5-HT Rezeptorsubtypen.

Im isolierten Koronararterien-Bioassay wurden epikardiale Leitungsgefäße der Makrozirkulation präpariert. Die Infusion von serotoninhaltigem Plasma in die isolierten Herzen hingegen erreichte Gefäße der koronaren Makro- und Mikrozirkulation zeitgleich. Mittels der hier verwendeten Bioassays war es von daher nicht möglich, zwischen Aspirat-Plasma induzierten Effekten in der Makro- und Mikrozirkulation zu differenzieren.

Eine Stimulation von 5-HT₁ Rezeptoren auf einem dysfunktionalen Endothel mit reduzierter NOS Funktion hingegen kann eine Vasokonstriktion verursachen (Vanhoutte et al., 2009). Diese serotoninabhängige Vasokonstriktion in der koronaren Zirkulation wurde ebenfalls in *in vivo* Atherosklerose-Tiermodellen (Chilian et al., 1990), an *ex vivo* Präparationen atherosklerotischer humaner epikardialer Koronararterien (Chester et al., 1990) und *in vivo* im Rahmen elektiver Koronarangiographien in Patienten mit angiographisch diagnostizierter koronarer Atherosklerose (Golino et al., 1991, Leosco et al., 1999) nachgewiesen.

4.4 Limitationen

Die hier verwendeten Modelle weisen eine Reihe von Einschränkungen auf, welche die Übertragbarkeit der erhobenen Befunde auf den Patienten einschränken:

- 1) Die Freisetzung von löslichen Mediatoren in das Aspirat während der Stentimplantation im Patienten ist ein lokales Ereignis und zudem ist die Perfusion während der Stentimplantation und der anschließenden Ballondilatation zumindest passager reduziert. Die Infusion von Plasma in die isolierten Herzen erfolgte hingegen als Bolus in den Pufferstrom und unter einem hohen Fluss mit anschließendem Auswaschen des Plasmas und exponierte das gesamte Gefäßsystem der isolierten Herzen anstelle eines lokalen Perfusionsterritoriums.

Dies führte zu einer artifiziellen Verdünnung des Aspirat-Plasmas und zu einer kurzen Kontaktzeit mit dem Gefäßsystem, wodurch die Aspirat-Plasma-induzierten Effekte abgeschwächt worden sein könnten.

- 2) Nicht beachtet wurde in den verwendeten Modellen der Einfluss der während der Stentimplantation freigesetzten partikulären Bestandteile: Diese können über eine Obstruktion in der koronaren Mikrozirkulation die koronare Durchblutung zusätzlich reduzieren und so zu einer Stagnation und Akkumulation von mobilisiertem Debris und löslichen Mediatoren in der Zirkulation flussabwärts der interventionell behandelten Stenose führen.
- 3) Es wurde nur eine sehr geringe Anzahl an Patientenplasmen getestet und bedingt durch das geringe Probenvolumen war es nicht möglich, alle Patientenplasmen in beiden Bioassays zu untersuchen.
- 4) Charakteristisch für das hier untersuchte Patientenkollektiv ist eine voll ausgebildete symptomatische koronare Atherosklerose mit zugrundeliegender endothelialer Dysfunktion (Ludmer et al., 1986, Davignon and Ganz, 2004). Eine pharmakologisch-induzierte endotheliale Dysfunktion durch NOS Inhibition simuliert allerdings nur einen Teilaspekt der Atherosklerose und vernachlässigt z.B. den Einfluss inflammatorischer Prozesse und Störungen des Lipidmetabolismus auf die vaskuläre Funktion (Dart and Chin-Dusting, 1999, Libby, 2012). Einerseits könnte das koronare Gefäßsystem der Patienten somit sensibler auf Vasokonstriktoren reagieren als das von gesunden jungen Tieren mit pharmakologischer NOS Inhibition. Andererseits erhalten Patienten eine Medikation, z.B Statine, die in der Lage sind die Gefäßfunktion bei vorliegender Dysfunktion wieder zu verbessern (Davignon and Ganz, 2004).

4.5 Klinische Implikationen

Die hier untersuchten Aspirat-Plasmen wurden Patienten entnommen, die eine kombinierte Medikation aus zwei Thrombozytenaggregationshemmern erhalten hatten. Dennoch konnte eine signifikante Serotoninfreisetzung in das koronare Aspirat-Plasma während der Stentimplantation nachgewiesen werden. Ursächlich für diese Serotoninfreisetzung ist vermutlich eine Thrombozytenaktivierung während der interventionellen Stentimplantation (Gawaz et al., 1996, Bax et al., 1994). Hierbei ist zu beachten, dass der eingesetzte Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel bei Vorliegen verschiedener Komorbiditäten eine herabgesetzte Wirksamkeit haben kann. Zu diesen Komorbiditäten zählen neben einem manifesten Diabetes Typ 2 (Angiolillo et al., 2014) und einer Niereninsuffizienz (Gremmel et al., 2013a) auch eine Obesitas (Gremmel et al., 2013b). Bei den hier untersuchten Patienten lagen diese Komorbiditäten zum Teil

kombiniert vor. Die Serotoninfreisetzung in Clopidogrel behandelten Patienten ist darüber hinaus interindividuell verschieden (Muller et al., 2010). Genauso variiert interindividuell die Zusammensetzung und freigesetzte Menge von partikulärem Debris, Mikropartikeln und löslichen Mediatoren während einer Koronarintervention und hängt neben der zugrundeliegenden Erkrankung letztendlich auch von der Beschaffenheit des behandelten Gefäßtyps ab (Horn et al., 2015, Baars et al., 2012, Kleinbongard et al., 2013a). Aufgrund dieser großen Variabilität erscheint eine individualisierte und letztlich aggressive medikamentöse Thrombozytenaggregationshemmung vor und während koronaren Interventionsverfahren sinnvoll, um so die Freisetzung von löslichen, vasoaktiven Mediatoren zu minimieren. Die sinkende Inzidenz von peri-interventionell auftretenden no-reflow Phänomenen und Myokardinfarkten wird zu einem großen Teil dieser aggressiveren Thrombozytenaggregationshemmung zugeschrieben (Brennan et al., 2015, Lee et al., 2011). Die Aspirat-Plasmen von nahezu allen hier untersuchten Patienten induzierten in isolierten Rattenherzen mit pharmakologisch inhibierter NOS eine transiente Beeinträchtigung der koronaren Perfusion und Reduktion des linksventrikulären Drucks. Genauso wie die transiente Perfusionsminderung bei Auftreten eines no-reflows im Patienten, war auch die hier beobachtete Reduktion der koronaren Perfusion rekurrent. Während die in den isolierten Herzen beobachteten Effekte unmittelbar nach Auswaschen des Aspirat-Plasmas rückläufig waren, bewirkte eine andauernde Inkubation mit Aspirat-Plasma in den isolierten Gefäßen erst nach einigen Minuten eine Vasokonstriktion (siehe Originalregistrierungen Abbildung 6 A), die dann ein Plateau erreichte. Plasma von Kontrollprobanden mit 6 $\mu\text{mol/l}$ Serotonin wurde infundiert, um den Effekt einer maximalen lokalen Serotoninkonzentration in der koronaren Zirkulation der Patienten zu simulieren. Hier zeigte sich in Herzen mit NOS Inhibition eine mehrere Minuten andauernde starke Reduktion der koronaren Perfusion und linksventrikulären Kontraktilität. Die Interaktion mit den zusätzlich freigesetzten Mediatoren und den embolisierten Mikropartikeln wurde hier nicht untersucht, jedoch erscheint ein sich gegenseitig verstärkender Einfluss über eine zusätzliche Stagnation und Akkumulation in der koronaren Mikrozirkulation im Patienten plausibel. Die im Rahmen eines koronaren no-reflows auftretende Perfusionsstörung lässt sich somit funktionell zumindest in Teilen über eine serotoninvermittelte Vasokonstriktion in der koronaren Makro- und Mikrozirkulation erklären.

5 Zusammenfassung

Die Implantation eines Stents in das Lumen eines atherosklerotisch stenosierten Koronargefäßes oder eines atherosklerotisch degenerierten aortokoronaren Venenbypasses verursacht eine Ruptur der atherosklerotischen Plaque. Wie die spontane, so führt auch die iatrogen durch eine Stentimplantation verursachte Plaque-Ruptur zu einer Freisetzung von partikulären Bestandteilen und Mikropartikeln auf der einen, und zum anderen zur Freisetzung von löslichen, vasoaktiven, thrombogenen und inflammatorischen Mediatoren auf der anderen Seite. Dieser „Cocktail“ aus mobilisierten partikulären Bestandteilen und freigesetzten löslichen Mediatoren embolisiert während einer Stentimplantation mit dem Blutstrom in die nachgeschaltete koronare Mikrozirkulation. Der Einfluss dieser embolisierten Partikel auf die koronare Perfusion und die kardiale Kontraktilität ist gut untersucht, wohingegen wenig über die Effekte der löslichen freigesetzten Mediatoren und potentiellen funktionellen Konsequenzen auf die koronare Perfusion und myokardiale Kontraktilität bekannt ist. Aspirations-/Okklusionschutzsysteme, verwendet während Stentimplantationen in Stenosen von Venenbypässen, ermöglichten die Gewinnung von koronarem Blut („Aspirat“). Hier wurde nach der Filtration von partikulären Bestandteilen das koronare Plasma in Rattenherz Bioassays untersucht. Koronararterielles Plasma, entnommen vor einer Stentimplantation, wurde mit koronararteriellem Plasma, entnommen nach einer Stentimplantation, (Aspirat-Plasma), verglichen. Isolierte epikardiale Koronararterien der Ratte wurden mit Plasma inkubiert und Plasma wurde in isoliert perfundierte Rattenherzen infundiert. Aspirat-Plasma löste in den isolierten Koronararterien der Ratte eine stärkere Vasokonstriktion aus als koronararterielles Plasma. Eine pharmakologische NOS Inhibition verstärkte diese Vasokonstriktion erheblich. In isolierten Rattenherzen mit NOS Inhibition reduzierte die Infusion von Aspirat-Plasma die koronare Perfusion und den linksventrikulären Druck stärker als die Infusion von koronararteriellem Plasma. In beiden Bioassays konnten die Aspirat-Plasma-induzierten Effekten durch die Serotoninrezeptor-Antagonisten Ketanserin und Pindolol aufgehoben werden. Die Infusion von peripher-venösem Plasma von gesunden Kontrollprobanden, dem exogenes Serotonin in den im Aspirat-Plasma gemessenen Konzentrationen hinzugefügt wurde, induzierte in isoliert perfundierten Rattenherzen mit inhibierter NOS mit Aspirat-Plasma vergleichbare Effekte. Unter den während einer Stentimplantation freigesetzten löslichen Mediatoren ist Serotonin der Hauptmediator einer vermittelten Vasokonstriktion in der koronaren Mikrozirkulation der Ratte mit dysfunktionalem Endothel: Serotonin reduziert nicht nur koronare Perfusion, sondern beeinträchtigt akut auch die kardiale Kontraktilität.

6 Literaturverzeichnis

1. ANGIOLILLO, D. J., JAKUBOWSKI, J. A., FERREIRO, J. L., TELLO-MONTOLIU, A., ROLLINI, F., FRANCHI, F., UENO, M., DARLINGTON, A., DESAI, B., MOSER, B. A., SUGIDACHI, A., GUZMAN, L. A. & BASS, T. A. 2014. Impaired responsiveness to the platelet P2Y₁₂ receptor antagonist clopidogrel in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 64, 1005-14.
2. BAARS, T., KLEINBONGARD, P., BOSE, D., KONORZA, T., MOHLENKAMP, S., HIPPLER, J., ERBEL, R. & HEUSCH, G. 2012. Saphenous vein aorto-coronary graft atherosclerosis in patients with chronic kidney disease: more plaque calcification and necrosis, but less vasoconstrictor potential. *Basic Res Cardiol*, 107, 303.
3. BAX, W. A., RENZENBRINK, G. J., VAN DER LINDEN, E. A., ZIJLSTRA, F. J., VAN HEUVEN-NOLSEN, D., FEKKES, D., BOS, E. & SAXENA, P. R. 1994. Low-dose aspirin inhibits platelet-induced contraction of the human isolated coronary artery. A role for additional 5-hydroxytryptamine receptor antagonism against coronary vasospasm? *Circulation*, 89, 623-9.
4. BELL, R. M., MOCANU, M. M. & YELLON, D. M. 2011. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 50, 940-50.
5. BOVE, A. A. & DEWEY, J. D. 1983. Effects of serotonin and histamine on proximal and distal coronary vasculature in dogs: comparison with alpha-adrenergic stimulation. *Am J Cardiol*, 52, 1333-9.
6. BRENNAN, J. M., AL-HEJILY, W., DAI, D., SHAW, R. E., TRILESSKAYA, M., RAO, S. V., BRILAKIS, E. S., ANSTROM, K. J., MESSENGER, J. C., PETERSON, E. D., DOUGLAS, P. S. & SKETCH, M. H., JR. 2015. Three-year outcomes associated with embolic protection in saphenous vein graft intervention: results in 49 325 senior patients in the Medicare-linked National Cardiovascular Data Registry CathPCI Registry. *Circ Cardiovasc Interv*, 8, e001403.
7. CHESTER, A. H., MARTIN, G. R., BODELSSON, M., ARNEKLO-NOBIN, B., TADJKARIMI, S., TORNEBRANDT, K. & YACOUB, M. H. 1990. 5-Hydroxytryptamine receptor profile in healthy and diseased human epicardial coronary arteries. *Cardiovasc Res*, 24, 932-7.
8. CHILIAN, W. M., DELLSPERGER, K. C., LAYNE, S. M., EASTHAM, C. L., ARMSTRONG, M. A., MARCUS, M. L. & HEISTAD, D. D. 1990. Effects of atherosclerosis on the coronary microcirculation. *Am J Physiol*, 258, H529-39.
9. DART, A. M. & CHIN-DUSTING, J. P. 1999. Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res*, 43, 308-22.
10. DAVIGNON, J. & GANZ, P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109, III27-32.
11. GAWAZ, M., NEUMANN, F. J., OTT, I., SCHIESSLER, A. & SCHOMIG, A. 1996. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation*, 93, 229-37.
12. GOLINO, P., PISCIONE, F., WILLERSON, J. T., CAPPELLI-BIGAZZI, M., FOCACCIO, A., VILLARI, B., INDOLFI, C., RUSSOLILLO, E., CONDORELLI, M. & CHIARIELLO, M. 1991. Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med*, 324, 641-8.

13. GREMMEL, T., MULLER, M., STEINER, S., SEIDINGER, D., KOPPENSTEINER, R., KOPP, C. W. & PANZER, S. 2013a. Chronic kidney disease is associated with increased platelet activation and poor response to antiplatelet therapy. *Nephrol Dial Transplant*, 28, 2116-22.
14. GREMMEL, T., STEINER, S., SEIDINGER, D., KOPPENSTEINER, R., PANZER, S. & KOPP, C. W. 2013b. Obesity is associated with poor response to clopidogrel and an increased susceptibility to protease activated receptor-1 mediated platelet activation. *Transl Res*, 161, 421-9.
15. HARRISON, R. W., AGGARWAL, A., OU, F. S., KLEIN, L. W., RUMSFELD, J. S., ROE, M. T., WANG, T. Y. & AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY NATIONAL CARDIOVASCULAR DATA, R. 2013. Incidence and outcomes of no-reflow phenomenon during percutaneous coronary intervention among patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 111, 178-84.
16. HEUSCH, G., KLEINBONGARD, P., BOSE, D., LEVKAU, B., HAUDE, M., SCHULZ, R. & ERBEL, R. 2009a. Coronary Microembolization From Bedside to Bench and Back to Bedside. *Circulation*, 120, 1822-1836.
17. HEUSCH, G., KLEINBONGARD, P., BOSE, D., LEVKAU, B., HAUDE, M., SCHULZ, R. & ERBEL, R. 2009b. Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside. *Circulation*, 120, 1822-36.
18. HILDEBRANDT, H., KAHLERT, P., HEUSCH, G. & KLEINBONGARD, P. 2015. Kinetics of cardioprotection by plasma dialysate from healthy volunteers undergoing remote ischemic preconditioning. *European Heart Journal*, 36, 580-580.
19. HORN, P., BAARS, T., KAHLERT, P., HEISS, C., WESTENFELD, R., KELM, M., ERBEL, R., HEUSCH, G. & KLEINBONGARD, P. 2015. Release of Intracoronary Microparticles during Stent Implantation into Stable Atherosclerotic Lesions under Protection with an Aspiration Device. *PLoS One*, 10, e0124904.
20. KAPLAN, B. M., BENZULY, K. H., KINN, J. W., BOWERS, T. R., TILLI, F. V., GRINES, C. L., O'NEILL, W. W. & SAFIAN, R. D. 1996. Treatment of no-reflow in degenerated saphenous vein graft interventions: comparison of intracoronary verapamil and nitroglycerin. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 39, 113-8.
21. KLEINBONGARD, P., BAARS, T., MOHLENKAMP, S., KAHLERT, P., ERBEL, R. & HEUSCH, G. 2013a. Aspirate from human stented native coronary arteries vs. saphenous vein grafts: more endothelin but less particulate debris. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305, H1222-9.
22. KLEINBONGARD, P., BOSE, D., BAARS, T., MOHLENKAMP, S., KONORZA, T., SCHONER, S., ELTER-SCHULZ, M., EGGBRECHT, H., DEGEN, H., HAUDE, M., LEVKAU, B., SCHULZ, R., ERBEL, R. & HEUSCH, G. 2011a. Vasoconstrictor Potential of Coronary Aspirate From Patients Undergoing Stenting of Saphenous Vein Aortocoronary Bypass Grafts and Its Pharmacological Attenuation. *Circulation Research*, 108, 344-U172.
23. KLEINBONGARD, P., BOSE, D., KONORZA, T., STEINHILBER, F., MOHLENKAMP, S., EGGBRECHT, H., BAARS, T., DEGEN, H., HAUDE, M., LEVKAU, B., ERBEL, R. & HEUSCH, G. 2011b. Acute vasomotor paralysis and potential downstream effects of paclitaxel from stents implanted for saphenous vein aorto-coronary bypass stenosis. *Basic Research in Cardiology*, 106, 681-689.
24. KLEINBONGARD, P., KONORZA, T., BOSE, D., BAARS, T., HAUDE, M., ERBEL, R. & HEUSCH, G. 2012. Lessons from human coronary aspirate. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52, 890-896.

25. KLEINBONGARD, P., SCHLEIGER, A. & HEUSCH, G. 2013b. Characterization of vasomotor responses in different vascular territories of C57BL/6J mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238, 1180-91.
26. KLONER, R. A., GANOTE, C. E. & JENNINGS, R. B. 1974. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*, 54, 1496-508.
27. LAER, S., REMMERS, F., SCHOLZ, H., STEIN, B., MULLER, F. U. & NEUMANN, J. 1998. Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *Br J Pharmacol*, 123, 1182-8.
28. LAMPING, K. G., KANATSUKA, H., EASTHAM, C. L., CHILIAN, W. M. & MARCUS, M. L. 1989. Nonuniform vasomotor responses of the coronary microcirculation to serotonin and vasopressin. *Circ Res*, 65, 343-51.
29. LANGLOIS, M., BREMONT, B., ROUSSELLE, D. & GAUDY, F. 1993. Structural analysis by the comparative molecular field analysis method of the affinity of beta-adrenoreceptor blocking agents for 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. *Eur J Pharmacol*, 244, 77-87.
30. LEBORGNE, L., CHENEAU, E., PICHARD, A., AJANI, A., PAKALA, R., YAZDI, H., SATLER, L., KENT, K., SUDDATH, W. O., PINNOW, E., CANOS, D. & WAKSMAN, R. 2003. Effect of direct stenting on clinical outcome in patients treated with percutaneous coronary intervention on saphenous vein graft. *Am Heart J*, 146, 501-6.
31. LEE, M. S., PARK, S. J., KANDZARI, D. E., KIRTANE, A. J., FEARON, W. F., BRILAKIS, E. S., VERMEERSCH, P., KIM, Y. H., WAKSMAN, R., MEHILLI, J., MAURI, L. & STONE, G. W. 2011. Saphenous vein graft intervention. *JACC Cardiovasc Interv*, 4, 831-43.
32. LEOSCO, D., FINESCHI, M., PIERLI, C., FIASCHI, A., FERRARA, N., BIANCO, S., LONGOBARDI, G., PISANI, E., BRAVI, A. & RENGO, F. 1999. Intracoronary serotonin release after high-pressure coronary stenting. *Am J Cardiol*, 84, 1317-22.
33. LIBBY, P. 2012. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 2045-51.
34. LIEDER, H. R., BAARS, T., KAHLERT, P. & KLEINBONGARD, P. 2016. Aspirate from human stented saphenous vein grafts induces epicardial coronary vasoconstriction and impairs perfusion and left ventricular function in rat bioassay hearts with pharmacologically induced endothelial dysfunction. *Physiological Reports*, 4.
35. LUDMER, P. L., SELWYN, A. P., SHOOK, T. L., WAYNE, R. R., MUDGE, G. H., ALEXANDER, R. W. & GANZ, P. 1986. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 315, 1046-51.
36. MANKAD, P. S., CHESTER, A. H. & YACOB, M. H. 1991. 5-Hydroxytryptamine mediates endothelium dependent coronary vasodilatation in the isolated rat heart by the release of nitric oxide. *Cardiovasc Res*, 25, 244-8.
37. MARTIN, G. R. 1994. Vascular receptors for 5-hydroxytryptamine: distribution, function and classification. *Pharmacol Ther*, 62, 283-324.
38. MARWOOD, J. F. 1994. Influence of alpha 1-adrenoceptor antagonism of ketanserin on the nature of its 5-HT₂ receptor antagonism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 21, 955-61.
39. MICHAELS, A. D., APPLEBY, M., OTTEN, M. H., DAUTERMAN, K., PORTS, T. A., CHOU, T. M. & GIBSON, C. M. 2002. Pretreatment with intragraft verapamil

- prior to percutaneous coronary intervention of saphenous vein graft lesions: results of the randomized, controlled vasodilator prevention on no-reflow (VAPOR) trial. *J Invasive Cardiol*, 14, 299-302.
40. MULLER, O., HAMILOS, M., BARTUNEK, J., ULRICHTS, H., MANGIACAPRA, F., HOLZ, J. B., NTALIANIS, A., TRANA, C., DIERICKX, K., VERCRUYSSSE, K., DE BRUYNE, B., WIJNS, W. & BARBATO, E. 2010. Relation of endothelial function to residual platelet reactivity after clopidogrel in patients with stable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*, 105, 333-8.
 41. MULVANY, M. J. & HALPERN, W. 1977. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*, 41, 19-26.
 42. PETROVIC, I., NEZIC, D., PERIC, M., MILOJEVIC, P., DJOKIC, O., KOSEVIC, D., TASIC, N., DJUKANOVIC, B. & OTASEVIC, P. 2015. Radial artery vs saphenous vein graft used as the second conduit for surgical myocardial revascularization: long-term clinical follow-up. *J Cardiothorac Surg*, 10, 127.
 43. RESNIC, F. S., WAINSTEIN, M., LEE, M. K., BEHRENDT, D., WAINSTEIN, R. V., OHNO-MACHADO, L., KIRSHENBAUM, J. M., ROGERS, C. D., POPMA, J. J. & PIANA, R. 2003. No-reflow is an independent predictor of death and myocardial infarction after percutaneous coronary intervention. *Am Heart J*, 145, 42-6.
 44. REZKALLA, S. H. & KLONER, R. A. 2002. No-reflow phenomenon. *Circulation*, 105, 656-62.
 45. SAFIAN, R. D. 2002. Accelerated atherosclerosis in saphenous vein bypass grafts: a spectrum of diffuse plaque instability. *Prog Cardiovasc Dis*, 44, 437-48.
 46. SDRINGOLA, S., ASSALI, A. R., GHANI, M., MOUSTAPHA, A., ACHOUR, H., YUSUF, S. W., FUJISE, K., ROSALES, O., SCHROTH, G. W., ANDERSON, H. V. & SMALLING, R. W. 2001. Risk assessment of slow or no-reflow phenomenon in aortocoronary vein graft percutaneous intervention. *Catheter Cardiovasc Interv*, 54, 318-24.
 47. SMITH, S. C., JR., FELDMAN, T. E., HIRSHFELD, J. W., JR., JACOBS, A. K., KERN, M. J., KING, S. B., 3RD, MORRISON, D. A., O'NEIL, W. W., SCHAFF, H. V., WHITLOW, P. L., WILLIAMS, D. O., ANTMAN, E. M., ADAMS, C. D., ANDERSON, J. L., FAXON, D. P., FUSTER, V., HALPERIN, J. L., HIRATZKA, L. F., HUNT, S. A., NISHIMURA, R., ORNATO, J. P., PAGE, R. L., RIEGEL, B. 2006. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation*, 113, e166-286.
 48. THE TIMI STUDY GROUP 1989. Comparison of invasive and conservative strategies after treatment with intravenous tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) phase II trial. The TIMI Study Group. *N Engl J Med*, 320, 618-27.
 49. THYGESEN, K., ALPERT, J. S., JAFFE, A. S., SIMOONS, M. L., CHAITMAN, B. R., WHITE. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task force for Universal Definition of Myocardial Infarction. 2012. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 60, 1581-98.

50. VANHOUTTE, P. M., SHIMOKAWA, H., TANG, E. H. & FELETOU, M. 2009. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*, 196, 193-222.
51. WEINTRAUB, W. S., JONES, E. L., CRAVER, J. M. & GUYTON, R. A. 1994. Frequency of repeat coronary bypass or coronary angioplasty after coronary artery bypass surgery using saphenous venous grafts. *Am J Cardiol*, 73, 103-12.

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 1, Anhang: Patientencharakteristika (n = 9)

Risikofaktoren/Komorbidität	
Hypertonus	9
Adipositas	7
BMI [kg/m ²]	28,5 ± 1,4
Ex-Nikotinabusus	5
Nikotinabusus	1
Diabetes mellitus	3
Niereninsuffizienz	4
Hyperlipidämie	9
Hyperurikämie	4
Laborparameter	
Gesamtcholesterin [mg/dl]	159,7 ± 6,9
HDL-Cholesterin [mg/dl]	47,4 ± 4,2
LDL-Cholesterin [mg/dl]	87,1 ± 7,2
Triglyzeride [mg/dl]	180,9 ± 27,5
Serumkreatinin [mg/dl]	1,2 ± 0,1
Medikation	
ACE-Hemmer	7
AT1-Rezeptorantagonist	1
Betablocker	8
Kalziumantagonisten	4
Statine	6
Diuretika	5
Antidiabetika	5
Aspirin	9
Clopidogrel	5
Prasugrel	2
Venenbypass	
Bypass Alter [Jahre]	12,5 ± 2,0
Stenosen Durchmesser [% des Lumens]	66,0 ± 3,3

Kontinuierliche Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. ACE = Angiotensin converting enzyme; AT1 = Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1; BMI = body mass index; HDL = High-density lipoprotein; LDL = Low-density lipoprotein. Tabelle modifiziert nach Lieder et al., 2016.

Tabelle 2, Anhang: Baseline Parameter der isolierten epikardialen Koronararterien der Ratte

	Exogenes Serotonin		Koronararterielles Plasma		Koronares Aspirat-Plasma			
L-NAME	-	+	-	+	-	-	+	+
Ketanserin/Pindolol	-	-	-	-	-	+	-	+
Diameter (innere Zirkumferenz in μm)	251±27	311±19	278±16	291±23	267±28	335±21	305±19	269±18
Maximale Vasokonstriktion [Δ mN] durch								
KCl ($1.2 \cdot 10^{-1}$ mol/l)	3,3±0,5	3,2±0,3	3,5±0,7	3,4±0,6	3,9±0,9	4,2±0,8	3,7±0,4	3,9±0,6
Serotonin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l)	4,1±0,3	4,2±0,8	3,9±0,5	4,0±0,8	4,2±0,7	5,4±1,2	4,1±0,5	5,6±1,1
Maximale Vasodilatation durch								
Carbachol ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/l)								
[als % einer Serotonin-induzierte Vokonstriktion]	77,1±7,7	77,6±10,6	79,1±9,8	80,3±5,3	76,4±2,9	86,9±10,4	74,9±9,3	70,7±9,5

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Statistischer Vergleich mittels Ein-Weg-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Tabelle modifiziert nach Lieder et al., 2016.

Tabelle 3 Anhang: Baseline Parameter der isoliert perfundierten Rattenherzen

Proband	Plasma	n	exogenes Serotonin [$\mu\text{mol/l}$]	L- NAME	Ket/ Pin	KF _{Baseline} [ml/min]	LVDD _{Baseline} [mmHg]	
Patient	Koronararteriell	6	-	-	-	11,8 \pm 0,6	95 \pm 3	
Patient	Aspirat	6	-	-	-	11,8 \pm 0,5	85 \pm 4	
Kontrolle	Peripher-venös	7	0	-	-	13,1 \pm 0,4	91 \pm 6	
Kontrolle	Peripher-venös	6	0,5	-	-	13,3 \pm 0,5	96 \pm 6	
Kontrolle	Peripher-venös	6	1	-	-	11,8 \pm 0,5	91 \pm 3	
Kontrolle	Peripher-venös	1	3	-	-	12,6 \pm 0,4	93 \pm 4	
Kontrolle	Peripher-venös	0	6	-	-	12,5 \pm 0,6	88 \pm 2	
		6						
Patient	Koronararteriell	9	-	+	-	10,0 \pm 0,2	87 \pm 3] #
Patient	Aspirat	9	-	+	-	9,4 \pm 0,4	82 \pm 4	
Kontrolle	Peripher-venös	7	0	+	-	11,1 \pm 0,4	90 \pm 3	
Kontrolle	Peripher-venös	6	0,5	+	-	10,0 \pm 0,3	88 \pm 6	
Kontrolle	Peripher-venös	6	1	+	-	10,1 \pm 0,7	89 \pm 2	
Kontrolle	Peripher-venös	1	3	+	-	10,0 \pm 0,7	81 \pm 6	
Kontrolle	Peripher-venös	0	6	+	-	10,2 \pm 0,5	80 \pm 4	
		6						
Patient	Koronararteriell	9	-	+	+	11,5 \pm 0,5	81 \pm 4] #
Patient	Aspirat	9	-	+	+	10,9 \pm 0,4	78 \pm 5	

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Messwerte für die Baseline wurden jeweils 4 min aufgezeichnet und gemittelt. KF_{Baseline} = koronarer Fluss zu Baseline; LVDD_{Baseline} = linksventrikulärer differenz Druck zu Baseline; Kontrolle = peripher-venöses Plasma von gesunden Kontrollprobanden; Ket/Pin = Ketanserin/Pindolol. Statistischer Vergleich mittels Ein-Weg-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur: # KF_{Baseline} und LVDD_{Baseline} P < 0.05 vs. isoliert perfundierte Rattenherzen ohne L-NAME. Tabelle modifiziert nach Lieder et al., 2016.

7.2 Abbildungen

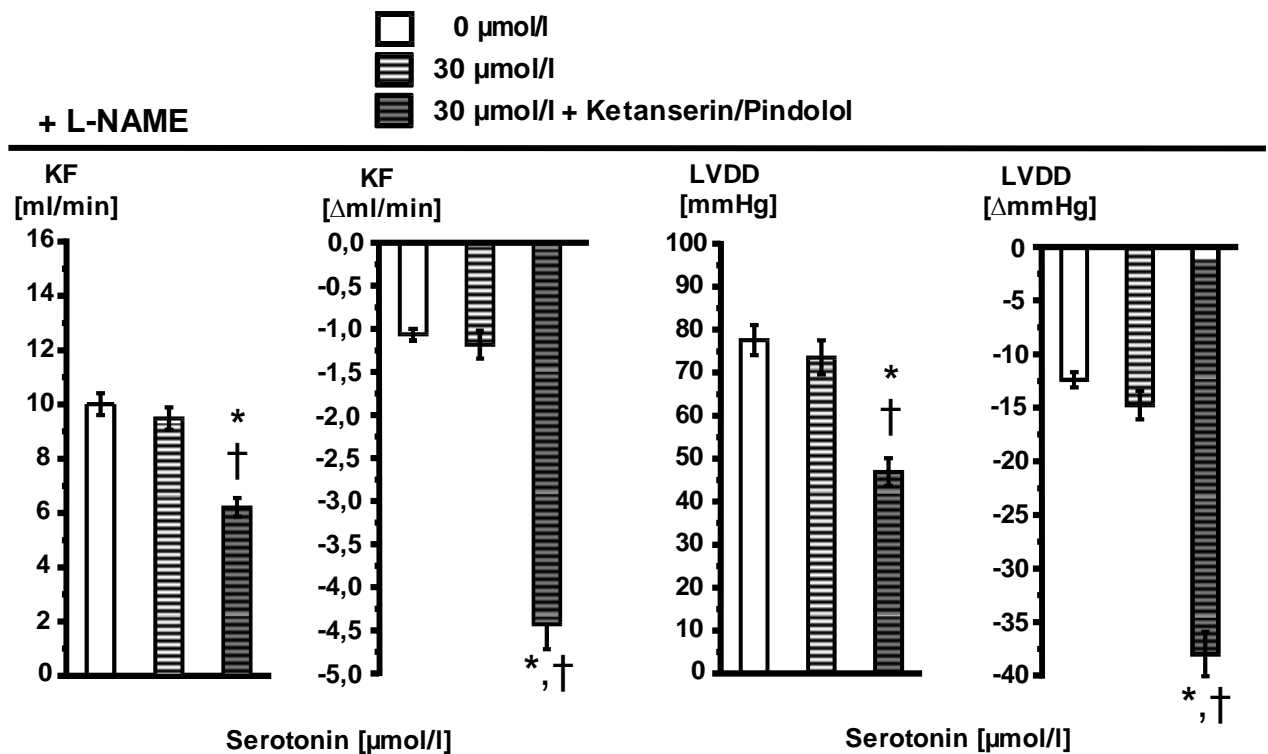


Abbildung 1, Anhang: Inhibition der serotoninabhängigen Reduktion in KF und LVDD

Peripher-venöses Plasma von Kontrollprobanden, ohne (0 $\mu\text{mol/l}$) und mit Serotonin (33 $\mu\text{mol/l}$) versetzt, infundiert in isoliert perfundierte Rattenherzen mit NOS Inhibition \pm Serotoninrezeptor-Antagonisten (Ketanserin/Pindolol). n=10 pro Gruppe. Darstellung als Absolutwerte nach Infusion und als Δ min/max zur Baseline. Statistischer Vergleich mittels Ein-Weg ANOVA mit Bonferroni-Korrektur.

8 Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
ACE	Angiotensin converting enzyme
AD	Aortendruck
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
atm	Physikalische Atmosphäre
BMI	Body mass index
h	Stunde
HDL	High-density lipoprotein
I.E.	Internationale Einheiten
KF	koronarer Fluss
LDL	Low-density lipoprotein
L-NAME	N-omega-Nitro-L-Arginine
	Methylester
LVP _{Sys}	Linksventrikulärer Druck systolisch
LVP _{Dia}	Linksventrikulärer Druck diastolisch
LVDD	Linksventrikulärer Delta Druck
min	Minute
Min/max	Minima und Maxima
n	Anzahl der Versuche
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	<i>Pondus hydrogenii</i> oder <i>Potentia Hydrogenii</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
z.B.	Zum Beispiel

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Verfassen dieser Arbeit unterstützt haben.

Allen voran danke ich PD Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard. Ohne Ihre Betreuung, Ratschläge, Geduld und Nachsicht wäre dieses Projekt nicht zum Abschluss gelangt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr.med. Dr. h.c. Gerd Heusch für die Möglichkeit am Institut für Pathophysiologie zu promovieren. Seine kritischen Bemerkungen und Ratschläge waren von Beginn an stets eine große Hilfe und haben die Qualität dieser Arbeit maßgeblich verbessert.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Pathophysiologie bedanken, die dieses Projekt administrativ unterstützten.

Ich danke meiner Familie, die mir auch in schwierigeren Phasen bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite stand.

10 Lebenslauf

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

***Lieder HR**, Baars T, Kahlert P, Kleinbongard P (2016): Aspirate from human stented saphenous vein grafts induces epicardial coronary vasoconstriction and impairs perfusion and left ventricular function in rat bioassay hearts with pharmacologically induced endothelial dysfunction. *Physiol Rep.* 4 (15):pii: e12874. DOI: 10.14814/phy2.12874

Lieder HR, Buechter M, Grueneisen J, Gerken G, Canbay A, Kahraman A (2016): Acute occlusion of the ductus pancreaticus due to abdominal aortic aneurysm: Uncommon cause of silent severe pancreatitis – a case report and review of the literature. *CRIM.* 3 (1). DOI: 10.5430/crim.v3n1p38

Tsagakis K, Dohle DS, Wendt D, Wiese W, Benedik J, **Lieder H**, Thielmann M, Jakob H (2015): Left subclavian artery rerouting and selective perfusion management in frozen elephant trunk surgery. *Minim invasive Ther Allied Technol.* 24 (5):311-6. DOI: 10.3109/3645706.2015.1069358

Tsagakis K, Dohle DS, Benedik J, **Lieder H**, Wendt D, Mourad F, Thielmann M, Jakob H (2015): Facilitated frozen elephant trunk surgery by zone 2 anastomosis. *Thorac cardiovasc Surg:* 63 (OP197). DOI: 10.1055/s-0035-1544449

Tsagakis K, Dohle DS, Benedik J, **Lieder H**, Jakob H (2013): Overall Essen's experience with the E-vita open hybrid stent graft system and the evolution of the surgical technique. *Ann Cardiothorac.* 2 (5):612-20. DOI: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.09.17

Kongressbeiträge

***Kleinbongard P, Lieder H, Kahlert P, Heusch G** (2015): Aspirate from stented aortocoronary saphenous vein grafts reduces coronary flow and left ventricular pressure in an isolated perfused heart. *FASEB JOURNAL* 29, Suppl 1,953.4

Posterpräsentationen

***Kleinbongard P, Lieder H, Kahlert P, Konorza TFM, Erbel R, Heusch G** (2013) Koronares Aspiratplasma von Patienten mit Vena-Saphena-Bypass-Stenose reduziert die koronare Mikrozirkulation und Ventrikelfunktion im Bioassay des isoliert perfundierten Rattenherzens. *Clin Res Cardiol* 102, Suppl 1, P1811

***Lieder H**, Kleinbongard P, Kahlert P, Konorza TFM, Erbel R, Heusch G. Das vasokonstriktorisches Potential von Aspiratplasma nach Stentimplantation im Bioassay des isoliert perfundierten Rattenherzens nach Langendorff. *Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg – Essen* 2013.

Unterstrichen: Erstautorenschaft

Fett: Koautorenschaft

***** Im Rahmen der Dissertationsarbeit